

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV POLYSACHARIDŮ NA VSTŘEBÁVÁNÍ KOFEINU Z NÁPOJŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KAROLÍNA OSECKÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV POLYSACHARIDŮ NA VSTŘEBÁVÁNÍ KOFEINU Z NÁPOJŮ

INFLUENCE OF POLYSACCHARIDES ON CAFFEIN ABSORPTION FROM BEVERAGES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KAROLÍNA OSECKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0654/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Karolína Osecká	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Vliv polysacharidů na vstřebávání kofeinu z nápojů

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je získat základní informace o možnostech využití vhodných polysacharidů ke zpomalení vstřebávání kofeinu z nápojů v žaludku. Rešeršní část zaměřit na poznatky o vstřebávání kofeinu, složení žaludečních šťav, chování polysacharidů (napr. hyaluronanu) v silně kyselém prostředí. Navrhnout základní experimenty zkoumající interakce kofeinu se zvoleným polysacharidem a chování polysacharidu v silně kyselém prostředí, případně modelových žaludečních šťavách. Na základě základních výsledků diskutovat schůdnost navrhovaného řešení zpomalení vstřebávání kofeinu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Karolína Osecká
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

1 ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá studiem interakcí mezi polysacharidem hyaluronanem (HA) a alkaloidem kofeinem (CAF). Důvodem, proč byla tato práce zaměřena na studování vlastností vodných roztoků hyaluronanu s kofeinem je ten, že systém hyaluronan-kofoein by mohl být přínosem pro zpomalení vstřebávání kofeinu.

Nejprve bylo zkoumáno, zda fotofyzikální vlastnosti kofeinu reagují na polaritu v různých rozpouštědlech. Na základě těchto výsledků byla studována interakce kofeinu a hyaluronanu pomocí fluorescence. Bylo sledováno emisní a absorpční spektrum kofeinu. Pro studium těchto interakcí byla vybrána HA o molekulové hmotnosti 1,7 MDa, která se mísila s kofeinem o koncentraci kofeinu obsaženého v kávě. Výsledky interakci, která by vedla k ovlivnění emisních vlastností CAF, neprokazují.

V kyselém prostředí docházelo k vytváření různých tvarů HA a pomocí odstředění bylo zkoumáno, zda HA v této formě interaguje s CAF, což se prokazovalo snížením absorbance CAF v supernatantu. Měření bylo prováděno ve čtyřech prostředích, a to v roztocích kyseliny chlorovodíkové při různém pH. Byl sledován vliv konstantního přídávku kofeinu a hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,7 MDa s různou koncentrací v různě kyselých roztocích.

Součástí práce bylo zjistit, jak se chová hyaluronan v silně kyselém prostředí. A dále zjistit pH v modelových žaludečních šťávách po příjmu Coca-Coly a Kofoly.

Získané výsledky o interakci hyaluronan-kofoein mohou sloužit k popisu chování kofeinu v přítomnosti zvoleného polysacharidu.

ABSTRACT

This bachelor thesis was focused on investigation of the interaction between the polysaccharide sodium hyaluronan (HA) and the alkaloid caffeine (CAF). The reason why this thesis was focused on study of aqueous solutions of hyaluronan with caffeine is that presence of polysaccharide can slow down the realising from hyaluronan-caffeine complex.

At first, it was determined whether the photophysical properties of caffeine react in different polarity solvents. Based on these results was studied the interaction of caffeine and hyaluronan using the fluorescence. Emission and excitation spectra of caffeine were observed. The HA of molecular weight of 1,7 MDa were chosen for the study of the interactions with the caffeine of concentration the caffeine contained in coffee. The results of interaction that would result to influence the emission properties of CAF, not show.

In acidic solutions leading to the formation of various shapes of HA and by centrifugation it was determined whether HA in this form interacts with CAF, which was shown to decrease the absorbance of the supernatant in the CAF. The solution and the mixtures were measured in four types of environment in hydrochloric acid solutions at different pH. The influence of constant addition of caffeine and the HA of molecular weights of 1,7 MDa with different concentrations in different acidic solutions.

As a part of the work was to determine how hyaluronan behaves in strongly acidic solution and then determine the pH in model gastric juices after intake of Coca Cola and Kofola.

The obtained results can be used as for description of the behavior of caffeine in the presence of selected polysaccharide.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kofein, kyselina hyaluronová, alkaloidy, fluorescenční spektroskopie

KEYWORDS

Caffeine, hyaluronic acid, alkaloids, fluorescence spectroscopy

OSECKÁ, K. Vliv polysacharidů na vstřebávání kofeinu z nápojů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 49 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala prof. Ing. Miloslavovi Pekařovi, CSc., Filipovi Mravcovi, Ing., Ph.D. a Tereze Halasové, Ing. za odborné konzultace, čas, který mi věnovali a cenné rady, kterými přispěli k vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat za podporu svým rodičům Janě a Petrovi Oseckým a Radkovi Hübloví.

OBSAH

1	ABSTRAKT	3
2	ÚVOD.....	7
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
4	ALKALOIDY	8
5	KOFEIN.....	10
5.1	Metabolismus kofeinu v těle.....	12
5.1.1	Kam kofein pronikne?	12
5.1.2	Metabolismus kofeinu	13
5.2	Obsah kofeinu	17
5.2.1	Čaj	19
5.2.2	Káva.....	21
6	KYSELINA HYALURONOVÁ.....	22
6.1	Charakteristika	22
6.2	Výskyt a úloha v organismu	23
6.3	Dělení hyaluronanu dle molekulové hmotnosti	23
6.4	Syntéza.....	24
6.5	Výroba kyseliny hyaluronové	25
7	FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE.....	26
8	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
8.1	Seznam použitých přístrojů a chemikálií.....	27
8.1.1	Použité přístroje	27
8.1.2	Použité chemikálie	27
8.1.3	Použitý kofein	27
8.1.4	Použitá kyselina hyaluronová	27
8.2	Příprava roztoků.....	28
8.2.1	Příprava zásobních roztoků kyseliny chlorovodíkové o různém pH	28
8.2.2	Příprava zásobního roztoku kyseliny hyaluronové	28
8.2.3	Příprava zásobního roztoku kofeinu.....	28
8.3	Příprava vzorků.....	28
8.3.1	Kofein v různých rozpouštědlech	28
8.3.2	Kofein s kyselinou hyaluronovou ve vodném prostředí.....	28
8.3.3	Kofein s kyselinou hyaluronovou v různě kyselém prostředí	28
8.4	Vlastní měření.....	28
8.4.1	Stanovení pH Kofoly a Coca-Coly	28

8.4.2	Stanovení pH v modelových žaludečních šťávách	28
8.4.3	Měření emisních spekter kofeinu v různých rozpouštědlech	29
8.4.4	Měření emisních spekter kofeinu a HA ve vodném prostředí	29
8.4.5	Měření adsorpčních spekter kofeinu v různě kyselém prostředí	29
8.4.6	Měření absorpčních spekter kofeinu a HA v různě kyselém prostředí	29
8.4.7	Vizuální pozorování chování kyseliny hyaluronové v kyselém pH.....	29
8.4.8	Vizuální pozorování chování kyseliny hyaluronové v Coca-Cole a Kofole ..	29
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	30
9.1	Měření emisních spekter kofeinu v různých rozpouštědlech	30
9.2	Měření emisních spekter kofeinu a HA ve vodném prostředí	32
9.3	Měření absorpčních spekter kofeinu a HA v různě kyselém pH	35
9.4	Stanovení pH v modelových žaludečních šťávách	42
9.5	Vizuální pozorování chování kyseliny hyaluronové v kyselém pH.....	43
10	ZÁVĚR	44
11	LITERATURA	45

2 ÚVOD

Proč je kofein tak oblíbený? Dnes je kofein součástí mnoha potravin, nápojů, doplňků stravy i léčiv. Pitný režim bývá často obohacován minimálně jedním šálkem kávy denně, ať už v zaměstnání, na cestách či doma. Jedním z nejčastějších nápojů na světě je právě káva. Existuje mnoho důvodů, proč pít kávu pro její příjemnou chuť, vůni a pro její očekávané účinky jako je povzbuzení, energie, zlepšení koncentrace, nálady, zvýšení pracovní výkonnosti, pomáhá nám překonávat únavu, pozitivně ovlivňuje naši bdělost a duševní aktivitu, a především pijeme kávu pro stimulační účinky kofeinu.

Při dlouhodobém užívání kofeinu však může dojít k toleranci na tuto látku, nebo až návyku a po vysazení k abstinenčním příznakům, tomu se říká kofeinismus. Většina z nás si den bez šálku lahodné kávy nedovede ani představit. Kofein patří mezi nejrozšířenější druhy závislostí, které známe. Sám kofein patří do skupiny, kterou nazýváme alkaloidy, kam společně i s ním řadíme například morfin, kokain, heroin a jiné silné drogy.

Kávu, čaj, čokoládu má každý rád, nejen protože skvěle chutnají, ale i proto, že se po nich cítí skvěle. A za naši dobrou náladu může právě kofein. Jeho blahodárné účinky ale nevydrží věčně, šlo by je nějakým způsobem prodloužit?

Cílem práce bylo získat základní informace o interakci mezi zvoleným polysacharidem hyaluronanem (HA) a alkaloidem kofeinem (CAF), protože systém hyaluronan-koferin by mohl být přínosem pro zpomalení vstřebávání kofeinu. Dále stanovit fotofyzikální vlastnosti kofeinu.

Součástí práce bylo zjistit, jak se chová hyaluronan v silně kyselém prostředí, případně modelových žaludečních šťávách. A dále zjistit pH v modelových žaludečních šťávách po příjmu Coca-Coly a Kofoly. Je dobře známo, že hyaluronan v kyselém prostředí geluje. V žaludku by tak mohl vytvořit gelové částice uzavírající kofein.

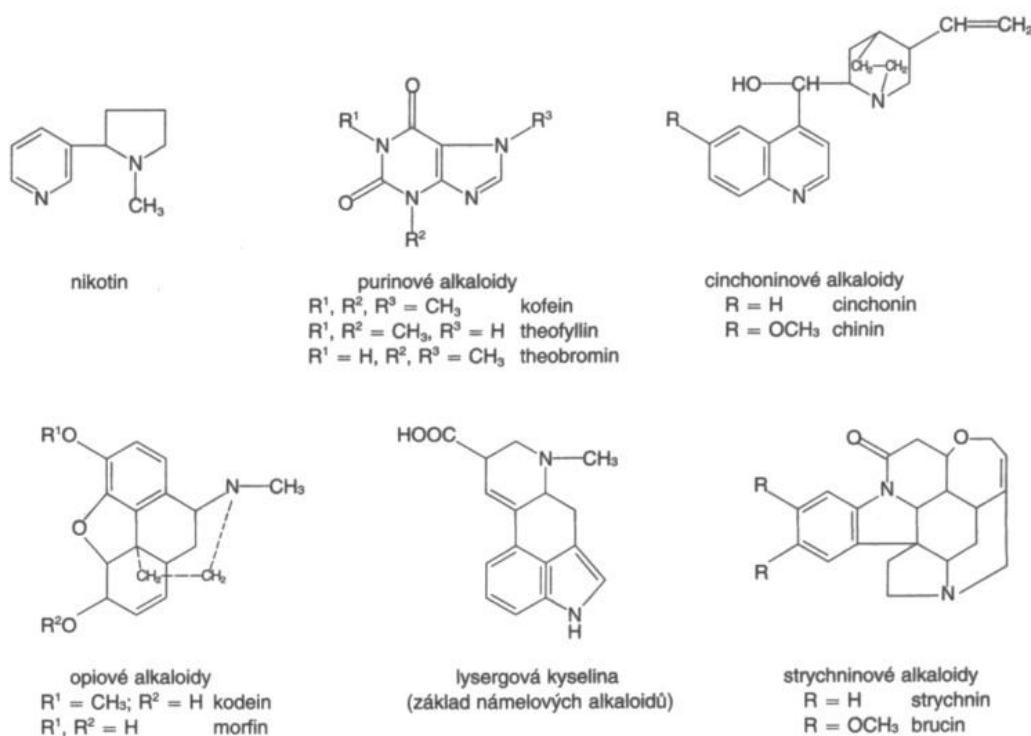
Získané výsledky o interakci hyaluronan-koferin mohou sloužit k popisu chování kofeinu v přítomnosti zvoleného polysacharidu.

3 TEORETICKÁ ČÁST

4 ALKALOIDY

V rostlinné říši nejpočetnější skupinu druhotného původu tvoří alkaloidy; bylo jich dosud izolováno kolem 7 000. Německý lékárník C. F. W. Meissner pojmenoval tuto skupinu alkaloidy v roce 1819 [1]. Není žádné hodnotící hledisko, které by charakterizovalo alkaloidy jako jednotnou homogenní skupinu přírodních látek. Alkaloid je bazická organická sloučenina s jedním nebo více heterocyklickými dusíkovými atomy v molekule, vyskytující se v přírodě ve formě solí s organickými kyselinami [2].

Alkaloidy se nejčastěji vyskytují v různých částech vyšších rostlin (především v semenech, listech, kořenech a kůře stromů aj.). Rostliny obvykle obsahují různé směsi alkaloidů. Alkaloidy se nacházejí také u určitých druhů mechů, hub a bakterií. U nezralých makovic v mléčné šťávě se nachází 20-30 % alkaloidů benzylochinolinového typu. Skupiny alkaloidů bývají označovány podle rostlinných druhů, v nichž se vyskytují (např. opiové, koniové, cinchonové, strychnové, akonitové, ktharantové alkaloidy), nebo podle základu jejich struktury (benzylochinolinové, tropanové, steroidní alkaloidy aj.). Alkaloidy mají převážně triviální názvy, vycházejí obvykle z názvu rostliny, v níž byly objeveny. Většina alkaloidových rostlin je známa velice dlouho v lidové medicíně pro jejich toxicitu nebo užitečné farmakologické vlastnosti. V roce 1806 německý lékárník F. N. Sertürner isoloval první alkaloid-morfin jako "uspávací prostředek z máku". První umělou syntésu alkaloidu koniinu z α -pikolinu v roce 1886 provedl A. Ladenburg [3].



Obr. 1. Struktura některých alkaloidů. [4]

K dělení alkaloidů lze použít různých hledisek. Mohou se klasifikovat na tři hlavní základní skupiny:

- pravé alkaloidy, kam patří například nikotin v tabáku
- pseudoalkaloidy, zde je zástupcem kofein v kávě a solanin v bramborech
- protoalkaloidy, kde příkladem je kapsacin vyskytující se v pálivých paprikách

Běžná klasifikace se používá podle heterocyklických systémů přítomných v molekule alkaloidu. Alkaloidy se rozlišují s jádrem pyrrolidinovým, pyridinovým, piperidinovým, peperazinovým, isochinolinovým atd. Pravým alkaloidem s pyridinovým jádrem je nikotin a řada jiných alkaloidů tabáku. V molekule některých alkaloidů se může vyskytovat kombinace různých heterocyklů, např. nikotin lze řadit mezi pyridinové i pyrrolidinové alkaloidy. Dnes se začíná prosazovat klasifikace alkaloidů na základě jejich biogenese, tj. syntetického původu [2].

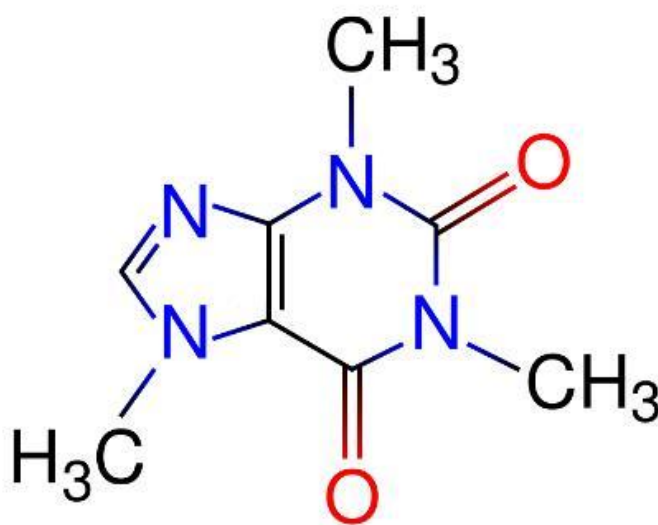
Alkaloidy jsou konečnými produkty sekundárního metabolismu a vykazují různé biologické účinky, nepodléhají výrazné degradaci. Většinou vznikají z aminokyselin, které poskytují heterocyklické atomy dusíku. V syntéze alkaloidů mohou být dále zahrnuty octová a mevalonová kyselina a donory jednoulíkových jednotek. Společnou vlastností téměř všech alkaloidů je, že jsou to látky fyziologicky neobyčejně aktivní. Mají silný a specifický účinek na organismus, některé alkaloidy jsou silně jedovaté. Alkaloidy mají různé, často specifické účinky na centra nervového systému. Využívají se v medicíně ve formě čistých látek, extraktů obsahujících směsi alkaloidů i jako synteticky vyrobené. V malých dávkách mají příznivé, většinou povzbuzující účinky, ve vyšších dávkách působí opačně. Terapeutické použití alkaloidů je často doprovázeno vedlejšími účinky, hlavně toxickými a narkotickými. Často jde o návykové látky [1].

Nejdůležitější alkaloidy používané v lékařství jako léčebné prostředky jsou např. morfin, získaný z vysušené mléčné šťávy nezralých makovic, opium, jako utišující prostředek k tlumení bolesti. Kodein vyráběný metylací morfinu, heroin acetylací dvou hydroxylových skupin morfinu acetylchloridem. Dále atropin, kokain z koky, tropanový alkaloid skopolamin, cinchonový alkaloid chinin, rauwolfiový alkaloid reserpin, snižující krevní tlak a tepajmalina serpentín, terpenový alkaloid akonitin, ricinin, strychnin a brucin, katharantové alkaloidy vinblastin a vinkristin a ze zrněk kávy, listů čaje a kakaových bobů kofein, který povzbuzuje centrální nervovou soustavu a srdeční činnost a podporuje činnost ledvin a zvyšuje tvorbu moči. Močopudný prostředek je též theobromin [1, 3].

5 KOFEIN

Alkaloidy odvozené od purinu, resp. od produktu jeho oxidace xanthinu, jsou nejrozšířenějšími alkaloidy v potravinách. Purinové alkaloidy jsou metylderiváty xanthinu. 1, 3, 7-trimetylxanthin, triviálně zvaný kofein, je nejrozšířenější z purinových alkaloidů. Je doprovázen dimetylxanthiny theobrominem, theofyllinem aparaxanthinem a rovněž monometylxanthinem heteroxanthinem a metylmočovými kyselinami, které jsou s výjimkou kakaa a čokolády minoritními alkaloidy, záleží na počtu nahrazených methylových skupin vodíky. Theofyllin, 1,3-dimetylxantin, má podobně jako theobromin, 3,7-dimetylxantin, o jednu metylovou skupinu v molekule méně. Theobromin je hlavním metyloxantinem v kakau, neobsahuje brom, a je to diuretikum (zvyšuje produkci moči). Čokoláda obsahuje 2,2% theobrominu a 0,1% kofeinu, ale kofein je sedmkrát silnější než theobromin [2, 5, 15].

Kofein je bílá, krystalická, hydrofobní látka bez zápachu, která má sumární vzorec $C_8H_{10}N_4O_2$ a chemický vzorec 1,3,7-trimetylxanthine. Molekula xanthinu má vodíky vázané na dusíky a nahrazením těchto vodíků methylovými skupinami, vznikne kofein. Vyskytuje se např. v kávových semenech, kakaových bobech, v listech čajovníku, v bobulích guarany, v cesmínu a maté. Povzbuzuje srdeční činnost, a proto se hojně používá v lékařství. Další názvy pro kofein jsou 7-Methyltheobromin, 3,7-Dihydro- 1,3,7-trimethyl-1H-purin-2,6-dion, Coffeinum [6, 7].



Obr. 2. Molekula kofeinu [8]

Tabulka č. 1 : Obecné informace o kofeinu [7, 9]

Chemický název	1,3,7-trimethylxanthin
Sumární vzorec	$C_8H_{10}N_4O_2$
Molární hmotnost	194,19 g/mol
Rozpustnost ve vodě (20 °C)	20 g/l
Relativní hustota (20 °C)	1,23 g/cm ³
Hodnota pH (10 g/l H ₂ O, 20 °C)	5,5-6,5
Teplota varu	178 °C (sublimuje)
Bod tání /bod tuhnutí	235-239 °C
Tenze par (20 °C)	20 kPa

Methylxanthiny jsou velmi stabilní sloučeniny a až na výjimku reakcí při fermentaci čajových listů a kakaových bobů k dalším reakcím během technologického zpracování surovin a skladování prakticky nedochází. Při výrobě zeleného a černého čaje vznikají dimethylxanthiny a další puriny jakožto produkty katabolismu kofeinu. Při pražení kávy zůstává obsah kofeinu prakticky na stejných hodnotách. Kofein získaný extrakcí z kávy a syntetický kofein se užívají ve farmaceutickém průmyslu a jako přísada do nealkoholických nápojů. Syntetický kofein se vyrábí methylací xanthinu, který je syntetizován z kyseliny močové. Trigonellin, který doprovází alkaloidy kávy, se však rozkládá na nikotinovou kyselinu a na těkavé sensoricky aktivní pyridiny. Poměr obsahů trigonellinu a kofeinu se využívá jako indikátor stupně pražení kávy. Kofein působí výrazně na lidské chuťové buňky a přispívá k celkové chuti kávy. I ve velmi nízkých koncentracích ovlivňuje chuť sladkých, hořkých a slaných přísad limonád. Také proto se do nich přidává. Z hlediska farmakologického působení patří mezi stimulanty (látky povzbudivé) [2,10].

Kofein má centrální i periferní účinky, které závisí na velikosti dávky. V denních malých dávkách (<3 mg.kg⁻¹) působí kofein jako stimulant centrálního nervového systému. Vyšší dávky mají různé neuroendokrinní účinky a velmi vysoké dávky působí teratogenně. Theobromin a theofyllin vykazují slabší stimulační účinky než kofein, mohou působit abnormality spermatogenních buněk [2].

Více než 99% přijatého kofeinu např. vypitím kávy se vstřebává okamžitě a nejsilnější účinek, kdy je v krvi nejvyšší koncentrace kofeinu, se dostavuje již za 15-45 minut. Potom začíná jeho hladina klesat a biologický poločas kofeinu je 3-5 hodin[11]. Účinky jsou vysoce individuální jako u všech návykových látek a rychle se vyvíjí tolerance. Po požití nadměrného množství kofeinu dochází k intoxikaci, projevující se nervozitou, neklidem, bušením srdce, nespavostí, bolestmi hlavy a podrážděním. Srdeční tep je zrychlený s nepravidelným rytmem. Smrtelná dávka bývá odhadována nad 5 gramů kofeinu, i když 37-letá žena po požití přibližně 27 g kofeinu v pokusu o sebevraždu přežila [12], ale 39-letá žena s obsahem 192 mg / l kofeinu v krvi a 29-letý muž s 567 mg/l kofeinu v krvi zemřeli. V obou případech byla příčinou smrti intoxikace kofeinem [13]. Otravy vyššími dávkami mohou být při podání metylxanthinů jako léků, zvláště nitrožilně. Příznaky jsou podobné těm, které zde byly uvedeny, přistupuje zvracení, bolest hlavy, mohou se objevit i křeče [5].

5.1 Metabolismus kofeinu v těle

5.1.1 Kam kofein pronikne?

Nežádoucí vlastností kofeinu je jeho snadné proniknutí biologickými ochrannými bariérami např. přes placentu do krve plodu. To znamená, že z kávy vypité matkou se kofein dostává do krevního oběhu plodu a to někdy ve značném množství. V jednom případě se našlo v krvi předčasně narozeného dítěte 0,1 mg/ml kofeinu v krevní plazmě, toto u dospělých už vyvolává toxické příznaky, matka totiž pila během těhotenství 24 šálků kávy denně. Kofein se také snadno dostává do mateřského mléka [14].

Mozek, centrální nervový systém

Pro psychické působení kofeinu je důležitá jeho schopnost dostat se do mozku, řada látek do mozku nepronikne, kofein však ano [10].

Kofein je populární jako psychoaktivní droga vzhledem k jeho stimulačním účinkům. Snižuje přenos adenosinu v mozku a tím podporuje funkce jako je bdělost, pozornost, nálada a vzrušení. Adenosin se obvykle hromadí v extracelulárním prostoru [10, 15].

Kofein má mírný stimulační, povzbudivý účinek jako teofylin. Teobromin tyto účinky nemá [5].

Dýchání

Theofylin uvolňuje hladké svalstvo průdušek a byl používán pro tento účel v léčbě astmatu. Spolu s kofeinem povzbuzuje ve vyšších dávkách dýchání. Působením v nervových centrech v horní části míchy, která intenzitu dechu řídí, se zvyšuje účinek plynu oxidu uhličitého, který tato centra dráždí při rychlejším dýchání za účelu odbourání CO₂ v krvi [5, 23].

Srdce, cévy

Theobromin rozšiřuje cévy a snižuje krevní tlak. Jde o snížení či zvýšení tepu a může dojít i k poruchám pravidelné činnosti srdce. Kofein může zvýšit i srdeční výkon tím, že se do krevního oběhu dostane větší množství krve. Kofein i teofylin rozšiřují cévy téměř v celém těle včetně koronárních tepen v srdci. Uvolňují do krve adrenalin a renin, proto dojde ke zvýšení krevního tlaku [15, 16, 20, 21]. Opakovaný příjem kofeinu se nazývá tolerance, to znamená snášenlivost organismu vůči nějaké látce. Tělo se naučí kofein snášet a přestane se zvyšovat krevní tlak [17, 31].

Ledviny

Kofein má močopudné účinky, zvyšuje vylučování vody ledvinami poměrně krátkodobě. Při dostatečném přísunu tekutin není 24hodinová rovnováha příjmu a výdeje narušena. Diuretický účinek kofeinu má vliv na vápník v těle, zvyšuje se riziko osteoporózy u starších lidí při nízkém příjmu vápníku. Také theofylin je silné diuretikum [2, 5].

Žaludek, žlučník, trávení

Důležitý je účinek kávy a čaje na žaludeční sliznici. Kofein zvyšuje vylučování žaludeční kyseliny i enzymu pepsinu. Kladný vliv na naše trávení mají látky, na které se při pražení přemění kyselina chlorogenová, především pyrokatechol, hydroctinon a pyrogallol, a které dráždí žaludeční sliznici. Kofein povzbuzuje stahy žlučníku a tok žluči, působí proti tvorbě žlučových kamenů [22, 23].

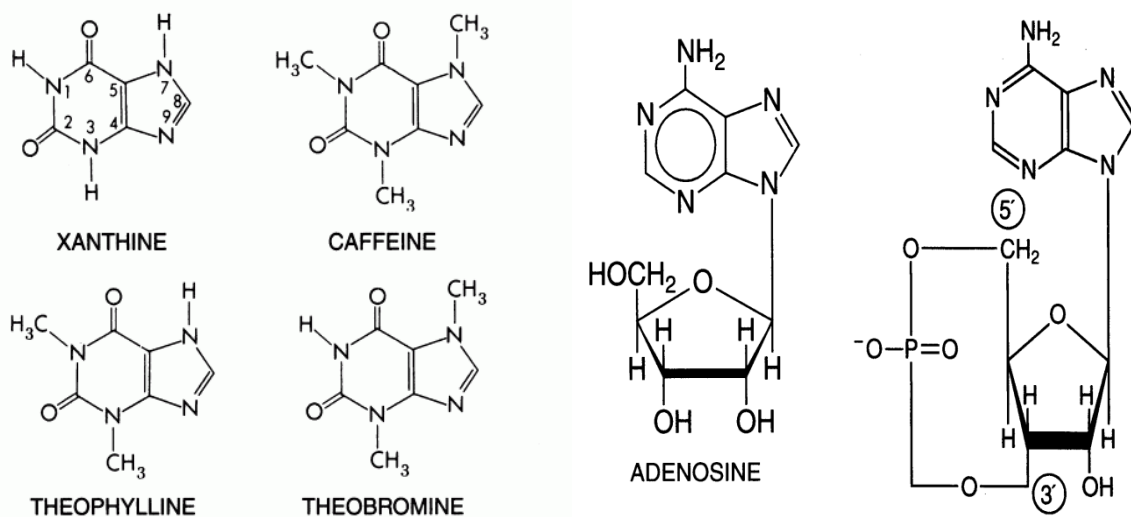
Yukihiko Hara z japonského výzkumného potravinářského ústavu provedl výzkum s koncentrátem katechinů ze zeleného čaje. U kuřat a prasat bylo zjištěno zlepšení složení střevní bakteriální flóry, které se projevilo snížením hnilobných produktů, i u lidí byly objeveny kladné účinky. Byly užívány tablety s 500 mg katechinů denně v třech měsících. Katechiny zvýšily podíl bakterií produkujících kyselinu mléčnou a potlačily působení bakterií hnilobných. Dále bylo zjištěno, že katechiny z čaje tlumí růst bakterií *Helicobacter pylori*, které se podílejí na vzniku žaludečních a duodenálních vředů [24].

Japonští vědci z Univerzity v Osace zjistili, že extrakt nebo izolované polyfenoly z oolong čaje, tedy z částečně fermentovaných listů, působí na kmeny streptokoka v ústech, kde jsou tyto bakterie primární příčinou zubního kazu. Výsledky naznačují, že zkoušené látky tlumí jejich schopnost přilnout k zubnímu povrchu a snižují produkci kyseliny [25].

5.1.2 Metabolismus kofeinu

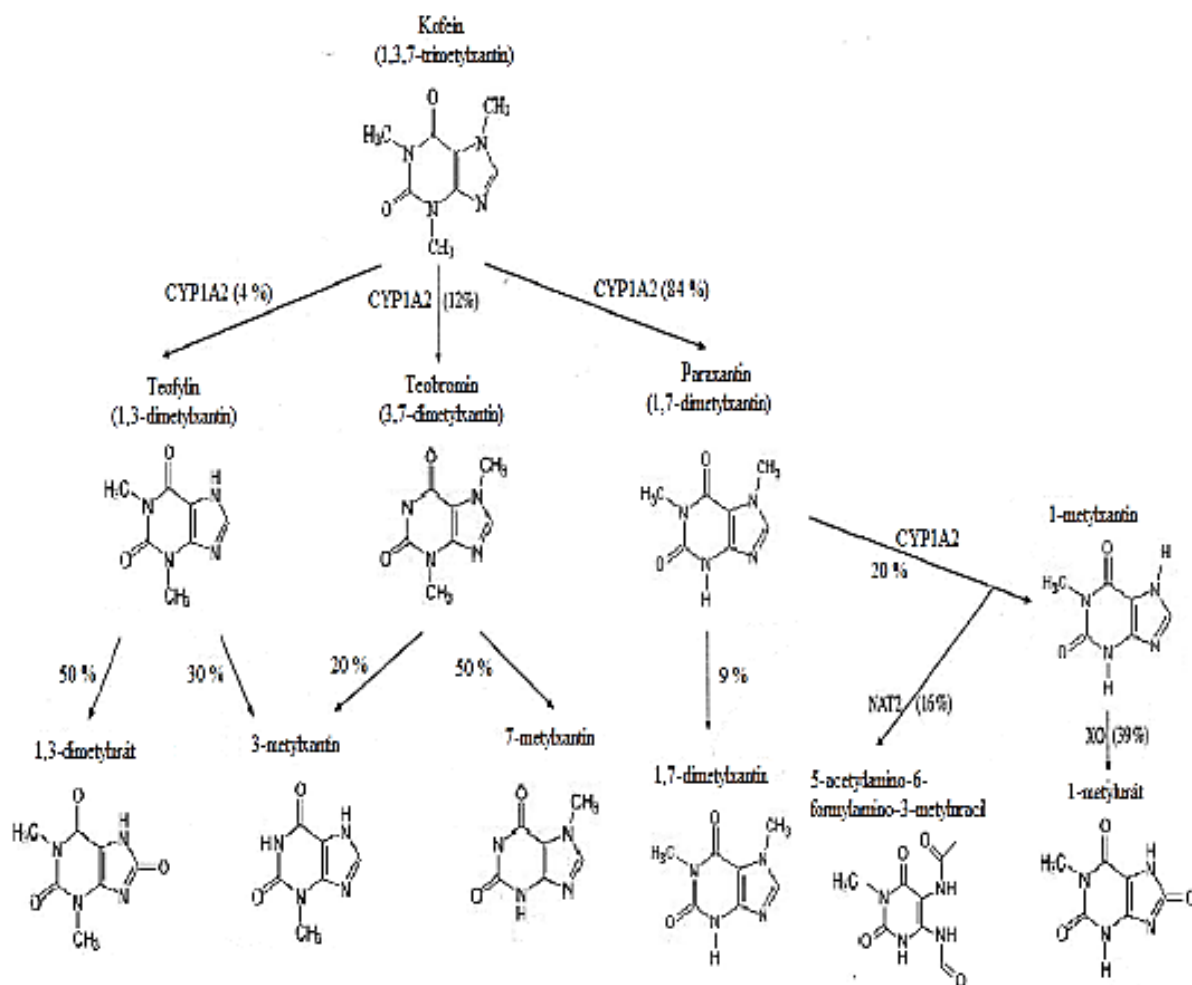
Po požití se kofein dostane do žaludku, kde se musí vstřebat z našeho trávicího ústrojí, proniknout žaludeční a střevní stěnou do krevních vlásečnic a s krví pak pronikat dál do těla. Kofein se v játrech chemicky přemění díky enzymům, které molekulu kofeinu pozměňují a to tak, že z ní odštěpí methylové skupiny, vznikají látky, které mají dvě methylové skupiny. Z molekul kofeinu vzniká více než 25 různých látek – metabolitů bez kofeinových účinků. Ty pak z krve odfiltrují ledviny. Kombinace kofeinu s nikotinem přeměnu kofeinu urychlí a hladina kofeinu v krevní plazmě klesá u kuřáků efektivněji. U žen v těhotenství se metabolismus kofeinu významně zpomaluje [14].

Kofein a theofylin využívají receptor adenosin k tomu, aby zabránily adenosinu v jeho činnosti, protože v těle ovlivňuje řadu funkcí: v mozku, cévách, ledvinách, plicích, trávicím ústrojí, imunitním systému, řídí aktivitu tělesných tkání. Jsou jeho antagonistou a působí proti němu, blokují ho. V řadě funkcí působí adenosin a kofein opačně, například hlavní účinek adenosinu v mozku je zastavit nervovou aktivitu, zatímco hlavní účinek kofeinu je naopak zvýšit nervovou aktivitu. Adenosin je adeninová molekula připojena k molekulám cukru ribóze nebo deoxyribóze. Podobnost v chemické struktuře mezi adeninovou částí adenosinu a kofeinové molekuly je klíčem k tomu, jak kofein funguje. Adenosin se akumuluje v extracelulární tekutině v důsledku buněčné fyziologie - a proto je propuštěn z obou neuronů a gliových buněk. Adenosin vzniká jako vedlejší produkt, který je produkován při využívání ATP (adenosin trifosfát, zdroj energie pro buněčný metabolismus). Adenin může být v těle deaminován na hypoxanthin, oxidován na xantin a opakovaně oxidován na kyselinu močovou pro vylučování. Cyklický AMP působí jako buněčná signální molekula, která přenáší signály z buněčné membrány do nitra buňky a jádra. Kofein působí jako inhibitor enzymu fosfodiesterázy, která způsobuje rozklad cyklického adenosinmonofosfátu. Prakticky tento jev nastane jen mírně v těle, protože množství potřebné k výraznému efektu je vyšší, než je množství k v plazmě pitím kávy. Vyžaduje 20krát tolik kofeinu k inhibici fosfodiesterázy, 40krát tolik kofeinu na zablokování GABAA receptorů a 100krát více kofeinu k mobilizaci intracelulárního vápníku. Kofein působí především přímo na blokování adenosinových receptorů a nepřímo pro receptory neurotransmiteru [15].



Obr. 3. Vzorec xanthinu, kofeinu, theofylinu, theobrominu a adenosinu a cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) [15].

Xanthin je produkt rozpadu-vznikne adenin a guanin, dvě purinové báze, které jsou klíčové složky DNA a RNA. Kofein je metabolizován v játrech enzymem cytochromem P450, především formou *N*-demethylace nebo aromatické hydroxylace. Nejdůležitějším enzymem je 1A2 isoforma cytochromu P450 (CYP1A2), která zajišťuje *N*-demetylaci. Na biotransformaci kofeinu se podílí další enzymy jako *N*-acetyltransferáza (NAT) a xantinoxidáza (XO). První produkty metabolismu jsou všechny dimethylxanthiny jak je tomu vidět na **Obr. 4.**: paraxanthin (84% 1, 7-dimethylxanthin), theobromin (12% 3, 7-dimethylxanthin) a theofylin (4% 1, 3-dimethylxanthin). Biologický poločas kofeinu u dospělého jedince je cca 5 hodin. Následně je kofein i jeho metabolity vyloučen z těla močí [15].



Obr. 4. Metabolismus kofeinu v játrech [15].

Stres

Kombinace kofeinu, který působí na krevní tlak a jeho současné zvýšení vyvolané stresem je rizikové. Pokud se káva pije ve zvýšené míře například při stresu z neúměrného pracovního zatížení nebo v konfliktních či emocionálně vypjatých situacích, tak kofein samotný zvyšuje hladiny dvou hormonů, které se stresem uvolňují do krve, adrenokortikotropní hormon a kortizol. Kofein může zhoršit působení stresu na duševní rovnováhu, atd. [5].

Kofein a theofylin jako léky

Kofein povzbuzuje naše dýchání a srdeční činnost. V injekční formě se používá k povzbuzení dechu a krevního oběhu, zejména při horečnatých stavech a infekčních onemocněních [5].

Léky, které si smíme koupit v lékárně ať na recept nebo bez předpisu, jako přípravky proti bolesti či k potlačení příznaků nachlazení také obsahují kofein, např. aspirin. Je to syntetická chemická sloučenina nesoucí název kyselina acetylsalicylová (ASA) a patří mezi nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID). Používá se jako cenný lék na zmírnění bolesti, zánětu či horečky. Ze všech NSAID je kyselina acetylsalicylová nejrozšířenější, protože je levná, dostupná a účinná při bolesti hlavy a nachlazení. Kofein (CAF) v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou se používá jako analgetikum pro úlevu od bolesti, ačkoliv nemá analgetický účinek. Kofein v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou nebo paracetamolem zvyšuje aktivitu až o 40% v závislosti na konkrétním typu bolesti. Vysoké dávky kofeinu – více než 1g, mohou naopak vyvolat bolesti hlavy. Kofein způsobuje zúžení mozkových cév a usnadňuje vstřebávání jiných léků [26].

Migrény

Kofein vyvolává zúžení průsvitu, vazokonstrikci, mozkových cév, to může přispět k jeho účinku při některých bolestech. Adenosinu A2A receptory jsou v endoteliálních buňkách, to má za následek vazodilataci účinku adenosinu (vazokonstriktivní účinek kofeinu na mozkové cévy se někdy využívají k léčbě migrény) [15].

Americký lékař F. C. Strong se domnívá, že jeho migrény patří k tomu typu, kdy dochází k povolení stěn cév v mozku, takže se zvětší jejich pulzace (vlivem srdečních stahů), a ty pak dráždí přilehlé nervy. Uvolnění cévní stěny mohou vyvolat některé složky potravy. Sám si na sobě vyzkoušel některé látky. Glykosol (glutamát sodný), známý z čínské kuchyně, ale také aminokyselina tyramin, jejímž bohatým zdrojem jsou některé sýry. Pak požil řadu analgetik a jejich kombinace, které obsahovaly kofein v dostatečném množství, například Excedrin, kde doporučená dávka pro dospělé obsahuje 130 mg kofeinu. Také když si vzal 100 mg kofeinu samotného, bolesti zmizely po dobu pěti hodin a to je doba, kdy už se z jeho krve podstatná část kofeinu vyloučila. Prof. Strong se domnívá, že bolest ustala díky stažení cév, vazokonstrikci. Tato zkušenost ovšem může platit jenom pro určitý typ migrény [5, 22].

Závislost

Žádost organismu po kofeinu je něco podobného, jako je tomu u kouření nebo dokonce s alkoholem či drogami. Kofein je považován za psychoaktivní látku. Dokonce je to nejrozšířenější psychoaktivní látka naší doby. Termín psychoaktivní shrnuje účinky léků, drog, substancí různého původu, které nějakým způsobem ovlivňují, pozměňují naše pocity, vnímání, myšlení, chování. Některé z psychoaktivních látek působí vzrušivě, stimulačně, např. amfetamin, jeho blízký derivát metamfetamin, také kokain. Jiné jsou tlumivé: sedativa, hypnotika jako pentobarbital. Psychoaktivita je základní součástí definice návykovosti, závislosti. Základní psychoaktivní účinek kofeinu je působení mírně stimulačně, budivě či povzbudivě. Všechny psychoaktivní látky ovšem nevyvolávají závislost. Na rozdíl od kokainu, amfetaminu, morfin, alkohol a nikotin, kofein neaktivuje uvolnění dopaminu (k D2 receptorů), který je spojován se závislostí. Návykové vlastnosti kofeinu se zdají být téměř úplně spojeny s abstinenními příznaky. K tomu je potřeba, aby jejich účinky byly žádoucí, vyvolaly touhu po opakování. Teprve potom dojde k tomu, že se užívání látky – drogy – stane nebezpečným návykem, potřebou, náruživostí. Důsledky jsou známy: narkomanie. Každé užití drogy posiluje, upevňuje její potřebu, touhu po další dávce [5, 10, 15].

Kofeinismus je návyk nadměrného požívání kofeinu. V pochutinách s vyšším obsahem kofeinu vedoucí často k otravě. Nejčastějším příznakem abstinence kávy bývá bolest hlavy nebo únava. Projevuje se utlumení myšlení, pocitem slabosti, apatií, ospalostí, zívání, nechutí k práci, malou činností, ale také nervozitou, podrážděností. Bolest hlavy u citlivých jedinců může být pronikavá, že vyžaduje analgetika. Abstinence se objevují obvykle za 12 až 24 hodin po poslední kávě a vrcholí po 20 až 48 hodinách. Příznaky mohou přetrvávat až jeden týden [5, 6].

5.2 Obsah kofeinu

Z hořkých látek jako přísady do potravin se nejvíce uplatňují sloučeniny ze skupiny alkaloidů, chmelových pryskyřic, oktaacetylsacharosy a některé heteroglykosidy. Z alkaloidů se hlavně využívá chinin při výrobě alkoholických i nealkoholických nápojů (*Tonicwater*). Vedle chininu se uplatňují i alkaloidy kávy a čaje, kofein a theobromin. Z flavonoidů vykazují hořkou chuť pouze flavanové glykosidy, jakou jsou neohesperidin, naringin a poncirin. Pro výrobu piva a některých nealkoholických nápojů se používá chmel, který je zdrojem řady hořkých látek [1].

Množství kofeinu je závislé na způsobu přípravy nálevu (teplotě vody, době extrakce aj.). Průměrný obsah kofeinu v jednom šálku kávy je asi 80 mg, v dekofeinované kávě 1-6 mg, v instantní kávě 29 až 91 mg, překapávané 37-132 mg a filtrované 93 až 127 mg. Káva bez kofeinu se vyrábí extrakcí kofeinu organickými rozpouštědly, zejména dichlormethanem, nověji superkritickým oxidem uhličitým. Získaný kofein se využívá k obohacování kolových nealkoholických nápojů a ve farmacii.

Listy čajovníku čínského (*Camelliasinensis*) obsahují asi 2% kofeinu a méně než 0,2% theobrominu v sušině (směs alkaloidů se dříve nazývala thein). Běžný šálek čaje obsahuje asi polovinu až třetinu kofeinu ve srovnání se šálkem kávy stejné velikosti.

Listy jihoamerického keře yerba maté (*cesmina paraguayská*, *Ilex paraguayensis*) z čeledi *Aquifoliaceae* obsahují 1.4 až 2,7% kofeinu v sušině a šálek nálevu maté má obsah kofeinu 18-

50 mg. Z nízkého stromu se mačetami odsekávají větve, které se suší a pak praží horkým vzduchem a drtí [2, 5].

Celkový obsah alkaloidů kakaových bobů (*Theobromacacao*) bývá v rozmezí 0,7-3,2% v sušině. Kakaovníky jsou stromy z rodu *Theobroma*, čeleď *Sterculiaceae*, původem v tropických pralesech Ameriky. Hlavního alkaloidu tedy theobrominu je 0,6-3,1%, kofeinu 0,02-0,5%. Hořká čokoláda obsahuje 0,3 až 0,7% theobrominu a 0,02-0,03% kofeinu, mléčná čokoláda 0,1-0,4% theobrominu a 0,01-0,02% kofeinu. Čokoládové nápoje obsahují 260-440 mg.dm⁻³ theobrominu a 10-12,5mg.dm⁻³ kofeinu.

V současných kolových nápojích (např. Coca-Cola) bývá obvykle část kofeinu pocházejícího z ořechů některých druhů koly, pěstují se hlavně čtyři druhy: *C. acuminata*, *C. anomala*, *C. nitida*, *C. verticillata*, kde je jeho obsah 1,5-2,5%. Zbytek je doplňován kofeinem, který pochází z jiných zdrojů (např. získaným při výrobě bezkofeinové kávy). Celkový obsah kofeinu v nealkoholických nápojích se zpravidla pohybuje v rozmezí 50-250 mg.dm⁻³ [5].

Kofein v množství 2,5-7,5% (resp. směs alkaloidů zvaných dříve guaranin) obsahují také guaranové oříšky, semena liany rodu *Paulinia* (*Paulliniacupana*) z čeledi *Sapindaceae*, pocházejí z tropů Jižní Ameriky. Po upražení se zpracovávají na hmotu připomínající chuť čokoládu. Slouží také k přípravě osvěžujícího nápoje [2].

Tab.č.2. Obsah kofeinu v nápojích [2, 5, 33]

Potravina nebo nápoj	Porce (ml)	Obsah kofeinu [mg]
Vařená káva	150–190	111–177
Filtrovaná káva	50–190	28–161
Espresso	50–150	74–99
Překapávaná káva	150–190	55–88
Instantní káva	250	40–160
Káva bez kofeinu	250	1–6
Černý čaj	250	50
Zelený čaj	250	13–50
Bílý čaj	200	15
Porcovaný čaj	250	55
Sypaný čaj	250	57
Kakao	250	4
Horká čokoláda	250	5–10
Energetické nápoje	375	50–80
Semtex	300	50
Redbull	100	32
BidShock	100	32
Kamikaze	275	70
Monster Energy	500	160
Kofola	100	15
Coca-cola	300	47
Colalight	300	47
Cherrycola	300	47
Pepsi cola	300	39
RC cola	300	36
Ledový čaj	200	30

5.2.1 Čaj

Jaké látky čaj obsahuje?

Při fermentaci působí enzymy, obsah vody se snižuje na polovinu. Theobrominu je v čaji podstatně méně než kofeinu. Barvu zeleného čaje obstarávají chlorofyly a karotenoidy. Černý fermentovaného čaje tvoří oxidované chlorofyly. Tyto pigmenty mají výrazný vliv na chuťovou kvalitu zelených i černých čajů. Největší podíl tvoří katechiny, spojené s léčivými účinky zeleného čaje. V šálku silného čaje vypijeme asi 180–240 mg různých katechinů. Polyfenolické látky patrně slouží rostlinám jako chemická obrana proti hmyzu a býložravcům. Bílkoviny v našich slinách však na sebe polyfenoly vážou a zmírňují tak jejich obranný účinek, takže je na jazyku pocítujeme jako mírně svíravou chuť, typickou pro čaj. Známé jsou však fermentací vyprodukované polyfenoly skupiny teaflavinů, které dodávají nálevům černého čaje červenooranžovou barvu a jsou jeho cennou složkou. Fermentací nezměněné zůstávají flavonoly kvercetin, kempferol a myricetin, které se dávají do souvislosti s antioxidantními účinky čaje černého. V malém množství jsou v čaji bílkoviny, sacharidy,

lipidy, karotenoidy, organické kyseliny, minerály. Aminokyselina teanin, přítomná v zeleném i v černém čaji se podílí příznivě na vytváření chuti a která ovlivňuje stimulační účinek kofeinu [4].

Antioxidanty

Vitamín E, C, selen jsou součástmi vitamínových směsí a různých dietetických doplňků. Jejich úlohou je tlumit aktivitu volných kyslíkových radikálů, které mají důležitou funkci v organismu, především v imunitním systému. Pokud se však vymknou kontrole regulačních mechanismů těla, mohou působit destruktivně na bílkoviny a nukleové kyseliny a podílet se na vzniku některých onemocnění. Regulačním mechanismům pomáhají udržet optimální hladinu volných radikálů také další antioxidanty, které si tělo samo nevytváří. Antioxidační účinky mají však i další látky v potravinách, hlavně v zelenině a ovoci z nich známějších je například beta-karoten [5].

Flavonoidy

Z látek s antioxidačními účinky je důležitá skupina polyfenolických látek skupina flavonoidů. Nacházejí se v zelenině a ovoci, ale i ve víně z hroznů a jsou také významnou složkou čaje. Bylo jich objeveno v přírodních zdrojích přes 4 000. Největší podíl flavonoidů v čajových listech zaujímá podskupina katechinů, který mají hlavního zástupce epigalokatechingalát. Když se u zeleného čaje voda odpaří do sucha, vznikne sušina, která obsahuje 30% katechinů. Fermentací se přemění na složitější molekuly a v černém čaji zůstane 6% katechinů. Po fermentaci čaj obsahuje více flavonolů jako kvercetin, kempferol a myricetin, které mají rovněž antioxidační účinky [29].

Jak mohou flavonoidy ovlivnit stav cévní stěny? Souvislost mezi cholesterolem a aterosklerózou je taková, že cholesterol putuje v krvi a je vázán na bílkoviny, a tyto kulovité molekuly složené z lipidu a proteinu se nazývají lipoproteiny. Cholesterol oxidovaný v nich s nízkou hustotou působením reaktivního kyslíku tvoří významnou součást aterosklerotických plátů na cévních stěnách. Oxidace lipoproteinu se dá zpomalit přidáním flavonoidů. Účinné jsou nejen katechiny, ale i ostatní polyfenolické látky [5].

Čaj černý

V Holandsku skupina vědců v rámci širšího výzkumu rizikových faktorů pro chronická onemocnění provedla zutphenskou studii, nazývá se podle města Zutphenu. Od roku 1985 bylo sledováno po pět let celkem 805 mužů ve věku 65-84 let, kvůli flavonoidům, množství, které jejich získají z potravin a nápojů. Zjišťoval se jejich obsah ve 28 druzích zeleniny, 12 druzích ovoce a 6 nápojích obvyklých v Holandsku. Byl sledován i celkový příjem energie, vitamínů C, E, beta-karotenu, vlákniny, kávy, alkoholu, tělesné aktivity, věk, krevní lipidy, obezita. Důležitý byl vztah těchto faktorů k výskytu ischemické choroby srdce a srdečního infarktu. Průměrné denní množství flavonoidů bylo získáno z potravy 26 mg, nejvíce kvercetinu. Největší zdroj byl černý čaj, 60 procent celkového množství odpovídalo přibližně 3 šálkům. Dále z cibule, 13 procent, z jablka 10 procent celkových flavonoidů [30].

5.2.2 Káva

Obsahové látky

Při pražení kávy se tvoří jak pigmenty tak melanoidiny, začnou se ztrácet organické látky s uvolněním oxidu uhličitého. Vytváří se sedm set těkavých látek, které společně vytvářejí charakteristické aroma pražené kávy. Extrakty obsahují i malá množství tuků a sacharidů jako je sacharóza, glukóza a fruktóza. Sacharidy zbylé po pražení jsou z diabetického hlediska zanedbatelné. Obsah tuků v zelené kávě kávovníku je dost vysoký 10-20 % záleží na druhu kávovníku více je v arabice, méně v robustě, ale kofeinu naopak arabice 1,3%, v robustě 2,4%, tedy téměř dvojnásobek. Kávový olej je tvořen triglyceridy kyselin linoleové a palmitové. Káva také obsahuje kafestolu a kahweolu, draslík, méně vápníku, hořčíku, fosfátů [4].

Káva nebo čaj?

Nositel účinků kávy, čaje a dalších kofeinových nápojů je právě kofein, ale ostatní látky obsažené v kávě či čaji se výrazně liší. Byla zjišťována rychlost vstřebávání kofeinu z kávy a čaje a nebyly nalezeny žádné podstatné rozdíly. Dále byly srovnávány účinky čaje, kávy a ochucené vody s kofeinem mezi sebou s vodou. Šálek čaje obsahuje méně kofeinu než káva, tak bylo upraveno množství černého fermentovaného čaje na 100 mg kofeinu jako v kávě a ochucené vodě. Nápoje se podávaly třikrát denně horké. Výsledky ukázaly zlepšení subjektivních pocitů bdělosti a sílící útlum. Účinek se dostavil už po 10 minutách. U čaje byly pozorovány během dne pocity a schopnosti na vyšší úrovni než u kávy či samotného kofeinu [31].

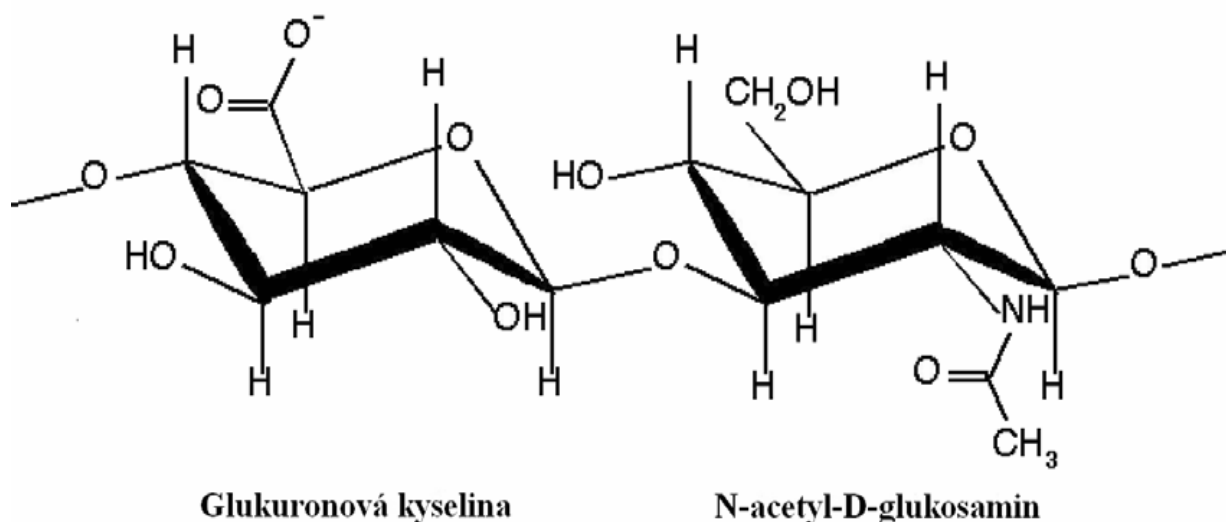
Káva a alkohol

Další využití kávy je působení proti účinkům alkoholu. Byl proveden výzkum s osobami, které byly pod vlivem obou drog objektivními metodami například měření vizuálních a sluchových reakčních časů nebo schopnosti stát zpříma. Vše bylo zkoušeno před pitím alkoholu, po něm, s kofeinem a bez kofeinu. Byl použit 1 decilitr alkoholu a 300 mg kofeinu. Z hodnocení výsledků bylo jednoznačné, že alkohol má nepříznivý účinek, zhoršil výkon ve všech použitých testech, i když se hladina alkoholu v krvi pohybovala mezi 0,05-0,09 procenty. Zhoršení rovnováhy se objevilo i po samotném kofeinu. Kofein zlepšil některé psychomotorické schopnosti poškozené alkoholem, ale jistěná náprava byla nedostatečná [27, 28].

6 KYSELINA HYALURONOVÁ

6.1 Charakteristika

První klinické použití kyseliny hyaluronové se datuje již od roku 1968, kdy byly popáleniny léčeny čištěnou kyselinou hyaluronovou. Kyselinu hyaluronovou objevili v roce 1934 Karl Meyer a John Palmer [37]. Izolovali ji z hovězího očního sklivce. Název vznikl ze slov hyaloid (sklivec) a uronová kyselina. Nejčastěji je tato látka označována jako hyaluronan [1, 2]. Kyselina hyaluronová, jakož to produkt, je bílá práškovitá látka bez zápachu, silně hydrofilní, která se nevyskytuje v živém organismu jako kyselina, protože glukuronová kyselina, kterou obsahuje, má ve své struktuře karboxylovou skupinu o pK 3 – 4. Karboxylová skupina je při neutrálním pH disociovaná. Vyskytuje se převážně tedy ve formě sodné a draselné soli. Proto se od roku 1996 začal užívat název hyaluronan. Je to nerozvětvený polymer složený z disacharidových jednotek, z nichž každá se skládá z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou střídavě propojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou. Řadíme ho do skupiny glukosaminoglykanů [38, 39].



Obr. 5 Hyaluronan sodný, strukturní vzorec [38]

Přítomnost negativního náboje na řetězci představuje potenciální interakce s kladně nabitými molekulami. Počet opakujících se disacharidových jednotek od několika stovek do deseti miliónů může dosáhnout molekulové hmotnosti až 4 milióny daltonů (jedna disacharidová jednotka má přibližně hmotnost 400 Da, kde $1 \text{ Da} \approx 1 \text{ g/mol}$). Průměrná délka řetězce závisí tedy na molekulové hmotnosti. Nejčastěji dosahuje hodnoty okolo 1 nm, ale při blízké se hodnotě 10 000 disacharidových jednotek může řetězec dosáhnout délky 10 μm [40, 41].

6.2 Výskyt a úloha v organismu

Nejvýznamnějším místem výskytu hyaluronanu jsou tkáně obratlovců (hlavní zdroje jsou uvedeny v tabulce č. 1) a extracelulární matrix, kde se diferencuje většina tkání, ale je také nepostradatelnou součástí tkání dospělých. U sedmdesátikilového lidského jedince je v těle přibližně přítomno 15g hyaluronanu. Největší množství (7 – 8 g) je obsaženo pokožce (epidermis) i ve škáře (dermis), což je koncentrace až 2,5 g/l. Dále se nachází ve sklivci lidského oka, v pupeční šňůře, v chrupavce nebo oocytech, kde ovlivňuje ovulaci. V synoviálních tekutinách se vyskytuje vysokomolekulární hyaluronan o vysokých koncentracích, kde jako nezbytný lubrikant slouží k absorbování nárazů. Když klesne koncentrace hyaluronanu v kloubních prostorách, dochází k poškození kloubů, nesnižuje se tření a netlumí se nárazy. Řešením jsou opakovatelné lékařské zákroky. Pokud dojde ke zjištění obsahu nízkomolekulárního hyaluronanu v krvi, obvykle to znamená přítomnost nádorového bujení. Rakovinné buňky produkují nízkomolekulární hyaluronan, aby unikly imunitnímu systému [39, 41, 42].

Tab. 3. Koncentrace hyaluronanu v tkáních a tkáňových tekutinách [43]

tkáň, tekutina	koncentrace [mg/l]
kohoutí hřebínek	7500
lidská pupeční šňůra	4100
lidská kloubní tekutina	1420 – 3600
hovězí nosní chrupavka	1200
lidský sklivec	140 – 338
lidská škára	200

6.3 Dělení hyaluronanu dle molekulové hmotnosti

- Vysokomolekulární hyaluronová kyselina, nad 1000 kDa nemá přílišnou biologickou funkci. Používá se jako kloubní lubrikant, k léčbě hojení ran, při očních operacích a pro svůj protizánětlivý účinek.
- Hyaluronan o 200-1000 kDa, chrání před UV zářením a je nosičem biologicky aktivních látek.
- Hyaluronan o 10-200 kDa, podporuje produkci melaninu, hojí diabetické defekty a aktivuje imunitní buňky.
- Hyaluronan pod 10 kDa má negativní účinky na lidský organismus [41, 46].

6.4 Syntéza

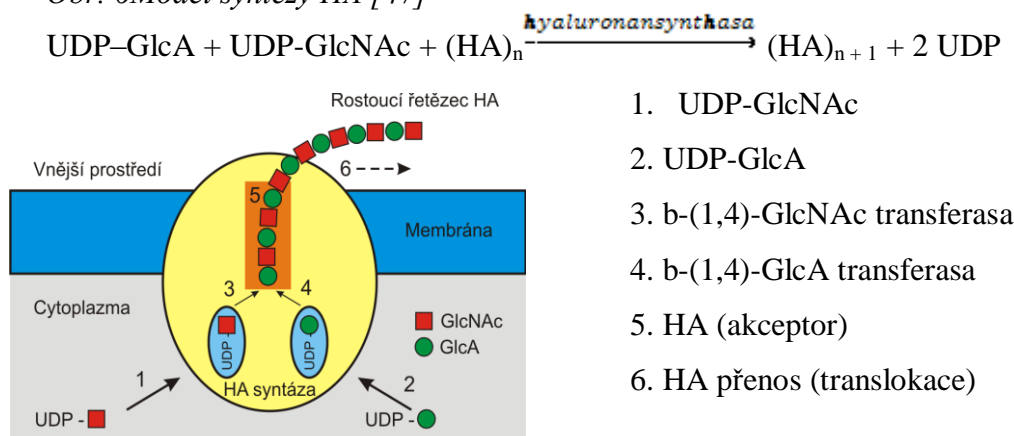
Syntéza hyaluronanu je obvykle vyvážena katabolismem, který zajišťuje konstantní koncentraci v tkáních. Syntéza probíhá díky specifickým transmembránovým enzymům tzv. hyaluronansyntázám. Jako jediné enzymy mají více funkcí:

- HYAL1 – objeven v séru, je to lysozomální enzym, který štěpí hyaluronan na malé fragmenty (2-10 disacharidových jednotek) [44, 45].
- HYAL2 – je nejznámější a velmi důležitý v katabolismu hyaluronanu. Tvoří fragmenty o velikosti kolem 50 disacharidových jednotek. Tento enzym se může spolu s molekulou CD44 vázat na buněčný povrch i na hyaluronan o vysokomolekulární hmotnosti.
- SPAM1 – enzym důležitý při fertilizaci [45].

Důležitým kontrolním mechanismem jsou inhibitory těchto enzymů. Navazují se díky konstantní inhibici enzymů. Uvolnění inhibitorů způsobí velmi rychlé zvýšení hladiny kyseliny hyaluronové. Syntéza průměrného řetězce hyaluronanu, který obsahuje deset tisíc disacharidových jednotek, je pro buňku energeticky náročná, proto je ve většině buněk pevně regulována. Hyaluronan jako takový se ve tkáních nevyskytuje samotný, ale je obklopen řadou dalších molekul, např. proteiny, nukleovými kyselinami, bakteriálními endotoxiny, chondroitinem sulfátem atd.

Většina glykosaminoglykanů je v živém organismu syntetizována v Golgiho aparátu a uvnitř buňky následně připojena k jaderným proteinům. Naopak hyaluronan je syntetizován v plazmatické membráně a není spojen s žádným jaderným proteinem. Molekula je prodlužována na redukujícím konci střídavým přenosem UDP-hyaluronanu k substrátům UDP-GlcNAc a UDP-GlcA při současném uvolnění UDP. Ostatní glykosaminoglykany rostou na neredukujícím konci [46].

Obr. 6 Model syntézy HA [47]



Další způsob, jak získat čistý hyaluronan, je izolovat jej z některých mikroorganismů. Některé bakterie mohou produkovat hyaluronan stejně jako savci, například *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes* nebo *Pasteurella multocida*. Zároveň jsou to lidské i zvířecí patogeny, schopné skrýt se před imunitním systémem svých hostitelů. A to tak, že se obklopí tenkou vrstvou hyaluronanu. Umožňuje jim to snadněji napadat hostitelské savčí organismy, protože jimi syntetizovaný hyaluronan produkuje na jejich povrchu ochrannou vrstvu. Ta má

stejnou strukturu jako hyaluronan v savčích tkáních. Bakterie nejsou tedy snadno rozpoznatelné imunitním systémem a organismus není schopen se účinně bránit [47].

6.5 Výroba kyseliny hyaluronové

Dříve byla kyselina hyaluronová získávána z lidské pupeční šňůry nebo se vyráběla z kohoutích hřebínků. Někteří výrobci tento způsob stále využívají. Nyní se takto získaná kyselina prodává pod komerčním jménem Healon či Opegan. V dnešní době převažuje biotechnologická výroba využívající některé kmeny *Streptokoků* obsahující polysacharid, který má shodnou strukturu s hyaluronanem savců. Jedním z výhod této technologie je příprava velmi čistého polymeru [46].

Hyaluronan je hygroskopickou látkou, kterou je třeba připravit do roztoků v přesné koncentraci. Proto je nelehké ho dlouhodobě skladovat. Hyaluronan je velmi náchylný na přítomnost mikroorganismů a degraduje už při kontaktu se vzdušným kyslíkem [48].

Dr. Endre A. Balazs jako první objevil použitelnou extrakční metodu izolaci kyseliny hyaluronové pro farmaceutické účely. Pupeční šňůra či kohoutí hřebínky byly zmrazeny, aby došlo k porušení buněčné membrány. Poté rozřezány na malé kousky. Dále byla kyselina hyaluronová extrahována ethanolem s cetylpyridinium chloridem, chloroformem a vodou. Extrakt byl čištěn, bylo upraveno pH a iontová síla. Tímto způsobem se získal produkt s obsahem bílkovin a malou výtěžností. Další způsob izolace byl proveden K. Kuběnou, A. Galatíkem a A. Blažejem, kdy preparát obsahoval menší podíl bílkovin a větší podíl kyseliny hyaluronové. Podstatou jsou některé modifikace polárních a thiolových skupin při kovalentní vazbě za pomoci alkylačních činidel [49].

Praktičtější je příprava kyseliny hyaluronové pomocí bakterií *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus*, která přináší největší výtěžnost. Kultivace se provádí v roztocích glukosy s obsahem kvasinek (při 33°C) a pH = 8,5.

Ke genetické modifikaci se využívá například bakterie *Bacillus subtilis*. Výhodou tohoto mikroorganismu je rychlé množení a produkce v malých množstvích endo a exotoxinů. V České republice je kyselina hyaluronová vyráběna společností Contipro Group v Dolní Dobrouči [41].

7 FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE

Luminiscence se dělí na:

- Chemiluminiscence
- Termoluminiscence
- Fotoluminiscence:
 - Fosforescence
 - Fluorescence

Definice fluorescence:

FLUORESCENCE = fotofyzikální jev, při kterém dochází k přechodu mezi tzv. povolenými stavy atomu, je to emise fotonu při přechodu z S_1 (S_2) do základního stavu S_0 vyzářením energie ve formě světla ve velmi krátkém čase.

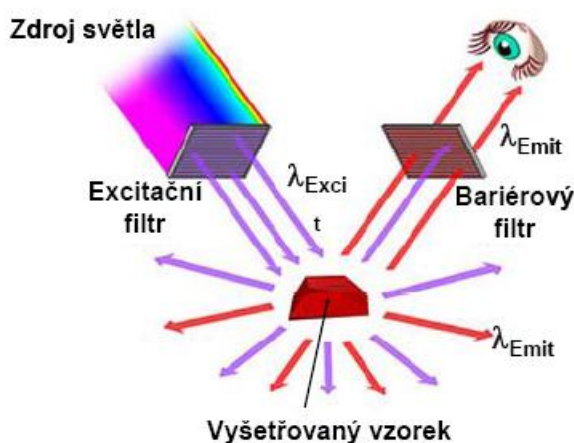
Emisní spektrum: je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitačního záření.

Excitační spektrum: je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Fluorofor je látka, která je schopná absorbovat světlo určité vlnové délky a následně emitovat světlo o delší vlnové délce.

Princip fluorimetru:

Fluorescence je z pravidla pozorována v kolmém směru ke směru paprsku. Na obrázku lze vidět jednotlivé součásti obecného fluorimetru: vysokotlaká xenonová lampa jako zdroj záření, dvojnásobný monochromátor, který vybírá záření o určité vlnové délce, fotonásobič jako detektor a vyhodnocovací zařízení obvykle počítač. Kyvety se používají křemenné o 1 cm a rozpouštědla nesmí fluoreskovat [34, 35].



Obr. 7. Schéma fluorimetru [36]

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií

8.1.1 Použité přístroje

- fluorimetr FLUOROLOG
- spektrometr UV/VIS Varian
- pH metr
- vortex
- analytické váhy DENVER INSTRUMENT
- odstředivka
- třepačka Heidolph VIBRAMAX 100

8.1.2 Použité chemikálie

- kofein
- kyselina hyaluronová
- rozpouštědla:
 - isopropylalkohol (číslo CAS: 67-63-0, číslo šarže: PP/2011/05317)
 - methanol (číslo CAS: 67-56-1, číslo šarže: Lot 4271B)
 - chloroform (číslo CAS: 67-66-3, číslo šarže: 03096 CK)
 - cyklohexan (číslo CAS: 110-82-7, číslo šarže: Lot# 1305483 53406P41)
 - aceton (číslo šarže: 1212021209)
 - N,N-dmethylformamid (číslo CAS: 68-12-2, číslo šarže: Lot# 1456725)
 - ethanol
 - voda mili-Q
- kyselina chlorovodíková
- Kofola (běžně dostupná)
- Coca-Cola (běžně dostupná)

8.1.3 Použitý kofein

Výrobce: SIGMA - ALDRICH

Výrobní číslo: 1001099469

Číslo šarže: Lot# 021M0092V

Číslo CAS: 58-08-2

Indexové číslo: 613-086-00-5

8.1.4 Použitá kyselina hyaluronová

Výrobce: Contipro Group s.r.o.

M_w = 1,7 MDa

Číslo šarže: 211-180

8.2 Příprava roztoků

8.2.1 Příprava zásobních roztoků kyseliny chlorovodíkové o různém pH

Byly připraveny roztoky kyseliny chlorovodíkové o pH = 1; pH = 1,7; pH = 2,3; pH = 3,2 s celkovým objemem 100 ml, ředěním koncentrované kyseliny chlorovodíkové destilovanou vodou.

8.2.2 Příprava zásobního roztoku kyseliny hyaluronové

Roztok 1 g/l kyseliny hyaluronové byl připraven rozpuštěním 0,1g hyaluronanu sodného ve 100 ml mili – Q vody.

8.2.3 Příprava zásobního roztoku kofeinu

Roztok kofeinu o koncentraci $3,09 \cdot 10^{-3}$ mol/l byl připraven rozpuštěním 0,06g kofeinu ve 100 ml mili – Q vody.

8.3 Příprava vzorků

8.3.1 Kofein v různých rozpouštědlech

Do osmi vialek bylo naváženo s přesností na čtyři desetinná místa 0,006 g kofeinu a smícháno s 10 ml příslušného rozpouštědla (isopropylalkoholu, ethanolu, ethanolu, chloroformu, cyklohexanu, acetonu, N,N-dimethylformamidu, vody mili-Q). Vše bylo promícháno na vortexu.

8.3.2 Kofein s kyselinou hyaluronovou ve vodném prostředí

Byl navážen kofein o hmotnosti 0,006 g, který byl smíchán s roztokem kyseliny hyaluronové, tak aby výsledná koncentrace kyseliny hyaluronové byla 1 g/l, 0,1 g/l, 0,01 g/l, 0,001 g/l s celkovým objemem 5 ml.

8.3.3 Kofein s kyselinou hyaluronovou v různě kyselém prostředí

Ze zásobního roztoku kofeinu o koncentraci $3,09 \cdot 10^{-3}$ mol/l a kyseliny hyaluronové o různých koncentracích (1 g/l, 0,1 g/l, 0,01 g/l, 0,001 g/l), kyseliny chlorovodíkové o různém pH byly připraveny roztoky celkovým objemem 9 ml.

8.4 Vlastní měření

8.4.1 Stanovení pH Kofoly a Coca-Coly

Do roztoku Kofoly a Coca-Coly byla vložena pH elektroda a bylo změřeno pH. Postup byl 3krát opakován.

8.4.2 Stanovení pH v modelových žaludečních šťávách

Do roztoku kyseliny chlorovodíkové o pH = 1 byla přikapávaná Coca-Cola po 5 ml (= jedno polknutí) a byly sledovány změny pH. Spotřebovaný objem Coca-Coly byl 0,5 l. Pokus byl několikrát opakován s jiným počátečním pH. Postup byl proveden také s Kofolou.

8.4.3 Měření emisních spekter kofeinu v různých rozpouštědlech

Na fluorimetru bylo měřeno emisní spektrum kofeinu při emisní vlnové délce 330 nm a excitační vlnové délce 320 nm v rozsahu vlnových délek od 330 nm do 500 nm. Bylo studováno emisní maximum kofeinu v různých rozpouštědlech (isopropylalkoholu, methanolu, ethanolu, chloroformu, cyklohexanu, acetonu, N,N-dimethylformamidu, vody mili-Q) a fotofyzikální vlastnosti kofeinu, zda reaguje na polaritu v různých rozpouštědlech.

8.4.4 Měření emisních spekter kofeinu a HA ve vodném prostředí

Na fluorimetru bylo měřeno emisní spektrum kofeinu a kyseliny hyaluronové ve vodné prostředí při emisní vlnové délce 330 nm a excitační vlnové délce 320 nm v rozsahu vlnových délek od 330 nm do 500 nm. Bylo studováno emisní maximum kofeinu v různých koncentracích kyseliny hyaluronové. Byly studovány interakce kofeinu a kyseliny hyaluronové.

8.4.5 Měření adsorpčních spekter kofeinu v různě kyselém prostředí

Byly proměřeny adsorpční spektra kofeinu ve vodě a v pH = 1 – 3,2. Byl pozorován molární extinkční koeficient a koncentrace kofeinu pro další měření.

8.4.6 Měření absorpčních spekter kofeinu a HA v různě kyselém prostředí

Po odstředění roztoku kyseliny hyaluronové o různé koncentraci (1 – 0,001 g/l) a kofeinu v různě kyselém pH = 1 – 3,2 o objemu 9 ml bylo, co nejrychleji, odebráno z hladiny 4,5 ml po centrifugaci a na spektrometru byla změřena adsorpční spektra od 200 nm do 800 nm. Na základě předcházejícího měření byla snížena koncentrace kofeinu o dva řády. Byly studovány interakce kofeinu a kyseliny hyaluronové.

8.4.7 Vizuální pozorování chování kyseliny hyaluronové v kyselém pH

Do roztoku kyseliny chlorovodíkové při pH = 1; pH = 1,7; pH = 2,3; pH = 3,2 byla přikapávaná kyselina hyaluronová. Bylo pozorováno chování kyseliny hyaluronové v kyselém pH.

8.4.8 Vizuální pozorování chování kyseliny hyaluronové v Coca-Cole a Kofole

Do Coca-Coly byla přikapávaná kyselina hyaluronová. Celý postup byl zopakován i s Kofolou. Bylo pozorováno chování kyseliny hyaluronové v Coca-Cole a Kofole.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

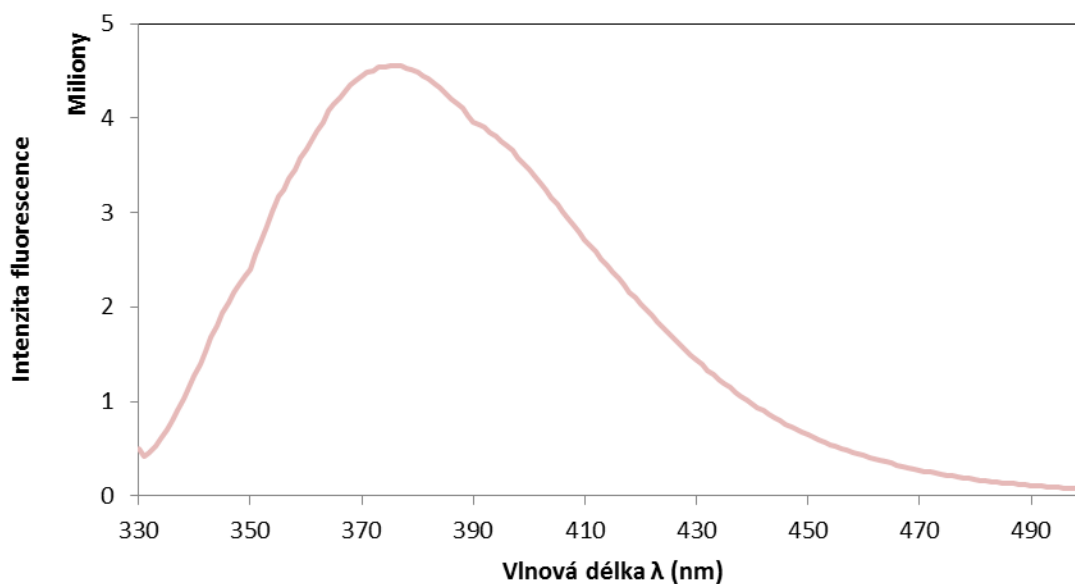
Cílem experimentální práce bylo stanovit, zda kofein s kyselinou hyaluronovou interaguje. Následně určit základní charakteristiky kyseliny hyaluronové v kyselém prostředí. Zjistit v modelových žaludečních šťávách, jak se mění pH po příjmu Kofoly nebo Coca-Coly.

Všechny získané hodnoty jsou zpracovány dále ve formě grafů a tabulek.

9.1 Měření emisních spekter kofeinu v různých rozpouštědlech

Výše popsaným postupem bylo měřeno emisní spektrum kofeinu v různých rozpouštědlech a bylo studováno, zda kofein reaguje na polaritu rozpouštědel.

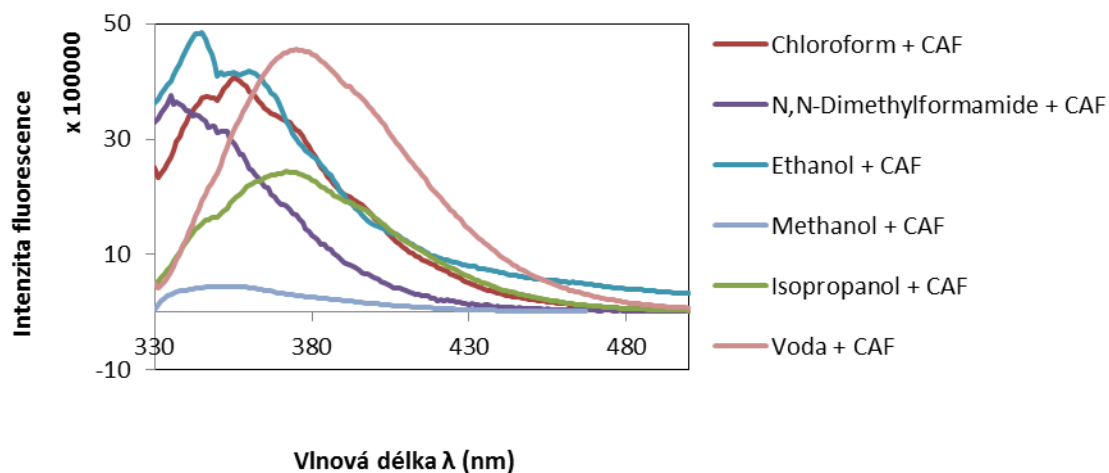
Nejdříve bylo proměřeno emisní spektrum kofeinu ve vodě **Graf 1.**, aby bylo možné porovnat různá spektra kofeinu-rozpouštědlo právě s vodou, protože kofein-HA byl připraven ve vodném prostředí. Dále byl kofein měřen v isopropylalkoholu, methanolu, ethanolu, cyklohexanu, acetonu, chlotoformu, N,N-dimethylformamidu proti blanku příslušného rozpouštědla. Z **Grafu 2, 3 a Tab. 1.** s výsledky vyplývá, že kofein reaguje na polaritu různých rozpouštědel, protože λ_{\max} kofeinu v jednotlivých rozpouštědlech je různé. Dochází tedy k posunu maxima kofeinu v různých rozpouštědlech. Bylo nutné odečíst emisní spektrum blanku daného rozpouštědla od emisního spektra kofein-rozpouštědlo.



Graf 1. Emisní spektrum kofeinu ve vodě

Tab. 1. Výsledná maxima kofeinu a různých rozpouštědel

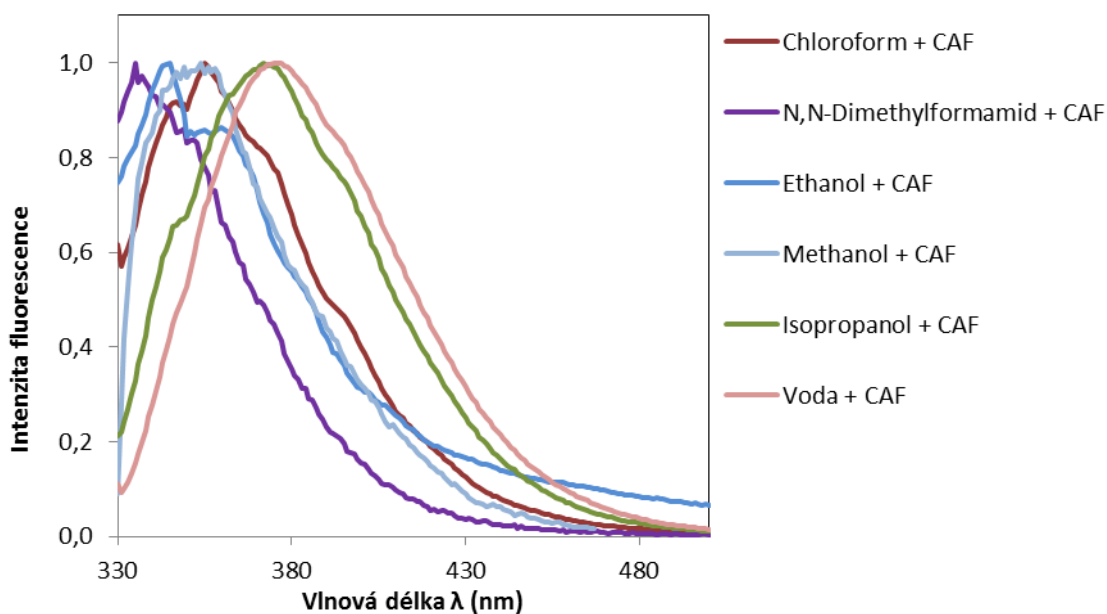
	λ_{\max} (nm)
Chloroform + CAF	347 ± 8
N,N-Dimethylformamid + CAF	355
Ethanol + CAF	345
Methanol + CAF	387
Isopropylalkohol + CAF	372
H ₂ O + CAF	$376,5 \pm 1,5$
Cyklohexan, aceton + CAF	-



Graf 2. Emisní spektrum kofeinu v různých rozpouštědlech

Z **Grafu 2.** s výsledky z **Tab. 1.** je patrné, že emisní spektrum kofein-voda lze srovnávat dle λ_{\max} s emisním spektrem kofein-isopropylalkohol.

Kofein v acetonu a cyklohexanu se nerozpustil a emisní spektrum kofein-aceton, kofein-cyklohexan nelze měřit.



Graf 3. Emisní spektrum kofeinu v různých rozpouštědlech se sjednoceným maximem

Z **Grafu 3.** je patrné, že emisní spektrum kofein-voda lze srovnávat dle tvaru spektra s emisním spektrem kofein-isopropylalkohol a kofein-methanol, protože spektrum ethanolu, chloroformu a N,N-dimethylformamidu má odlišný nepravidelný tvar.

9.2 Měření emisních spekter kofeinu a HA ve vodném prostředí

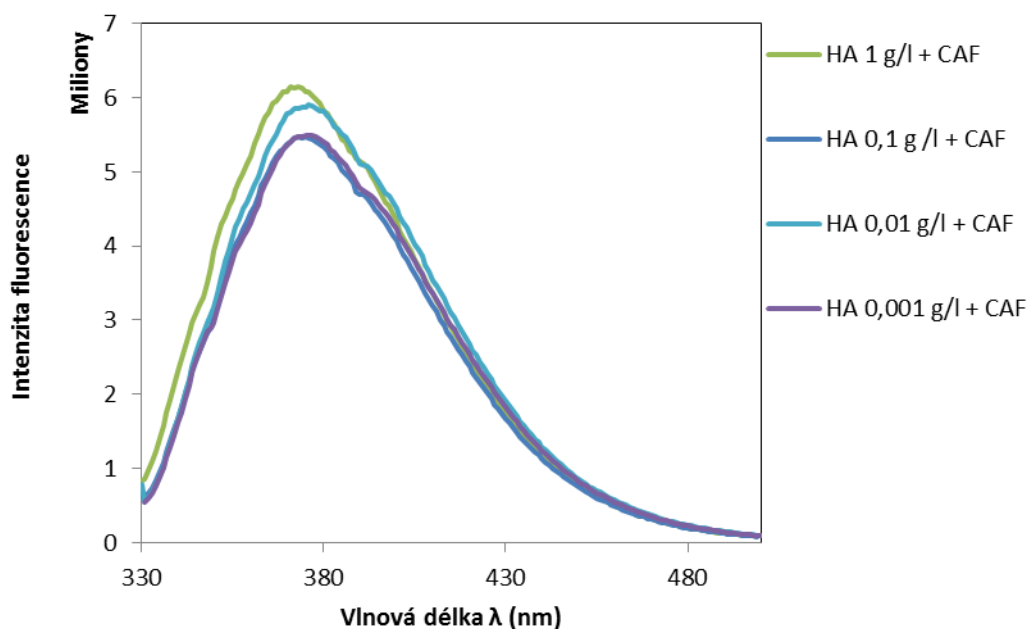
Výše popsaným postupem bylo měřeno emisní spektrum kofeinu v různých koncentracích kyseliny hyaluronové (1 g/l, 0,1 g/l, 0,01 g/l, 0,001 g/l).

Nejdříve bylo proměřeno emisní spektrum kofeinu ve vodě **Graf 1.** aby bylo možné porovnat různá spektra kofeinu-HA právě s vodou, protože kofein-HA byl připraven ve vodném prostředí a dále byl kofein měřen s různými koncentracemi kyseliny hyaluronové proti blanku kyseliny hyaluronové příslušné koncentrace. Bylo nutné odečíst emisní spektrum blanku kyseliny hyaluronové o dané koncentraci od emisního spektra kofein-kyselina hyaluronová.

Z **Grafu 9. a Tab. 2.** s výsledky je patrné, že nebyl zjištěn žádný posun emisních maxim, z toho vyplývá, že nedošlo k interakci mezi kofeinem a kyselinou hyaluronovou, protože maxima kofeinu ve vodě i v kyselině hyaluronové se téměř rovnají.

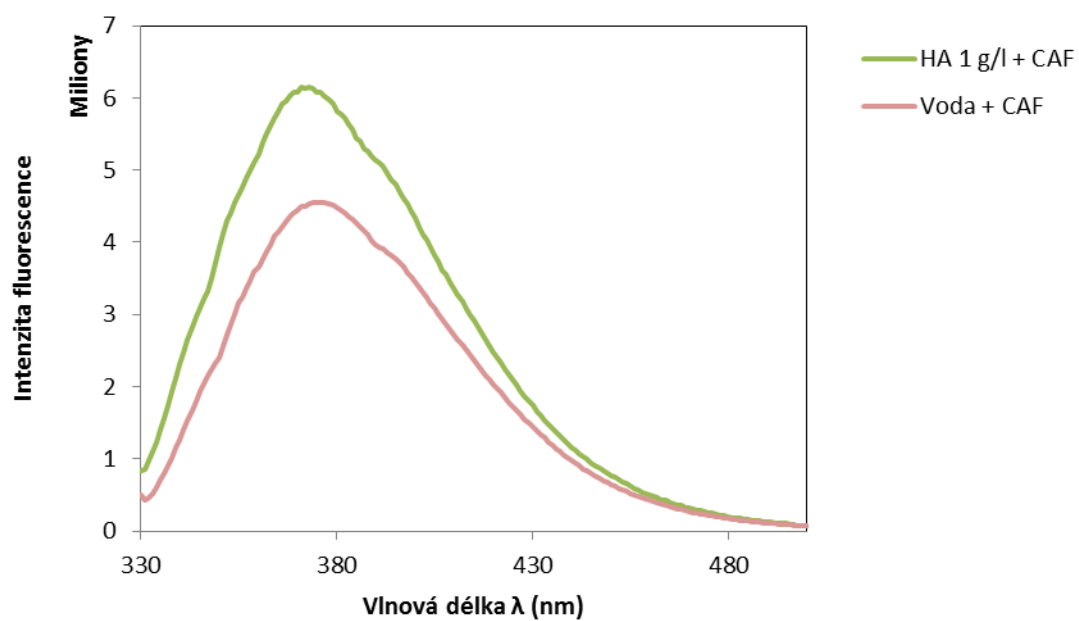
Tab. 2. Výsledná maxima kofein-voda a různé koncentrace kyseliny hyaluronové

	λ_{\max} (nm)
H ₂ O + CAF	376,5 ± 1,5
HA 1 g/l + CAF	376
HA 0,1 g/l + CAF	376 ± 1
HA 0,01 g/l + CAF	376 ± 2
HA 0,001 g/l + CAF	376 ± 2

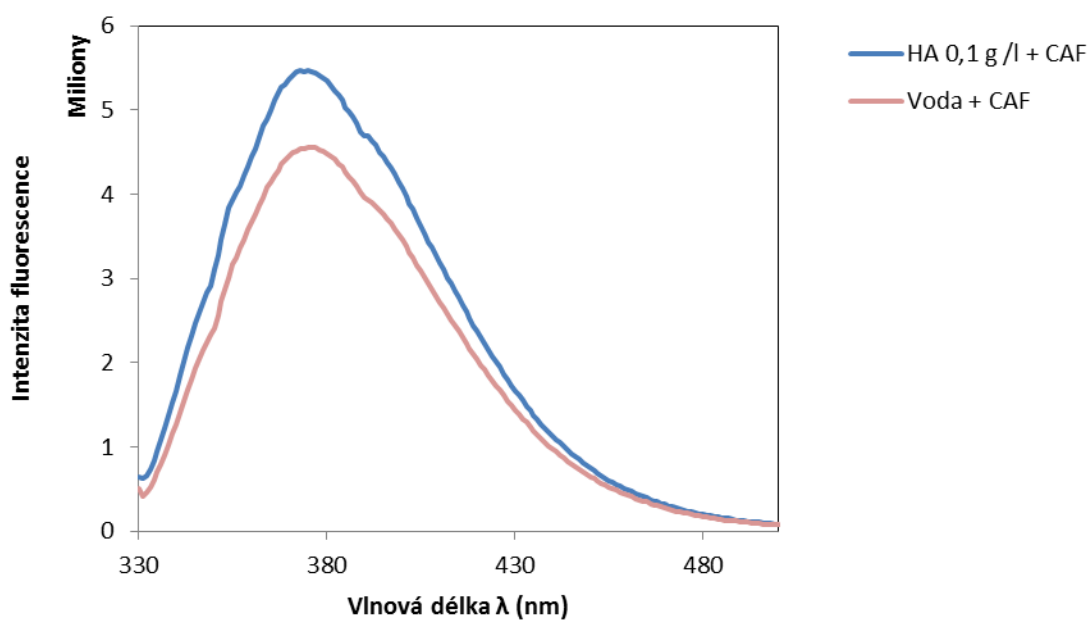


Graf 4. Emisní spektrum kofeinu s různými koncentracemi HA

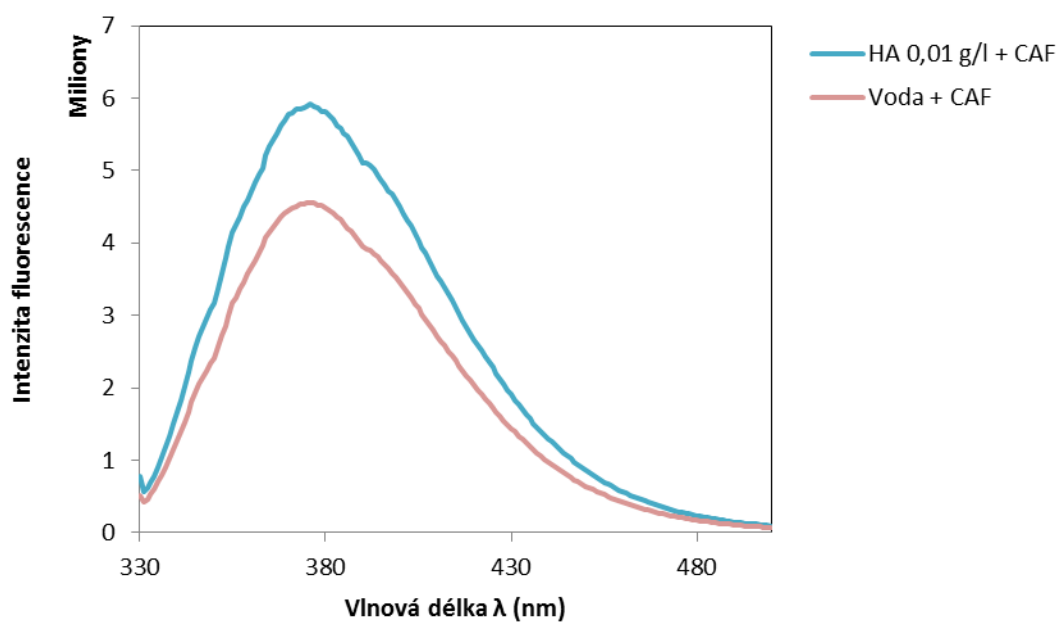
Z **Grafu 5-8.** lze porovnat emisní spektra různě koncentrovaných vodných roztoků kyseliny hyaluronové s emisním spektrem kofein-voda.



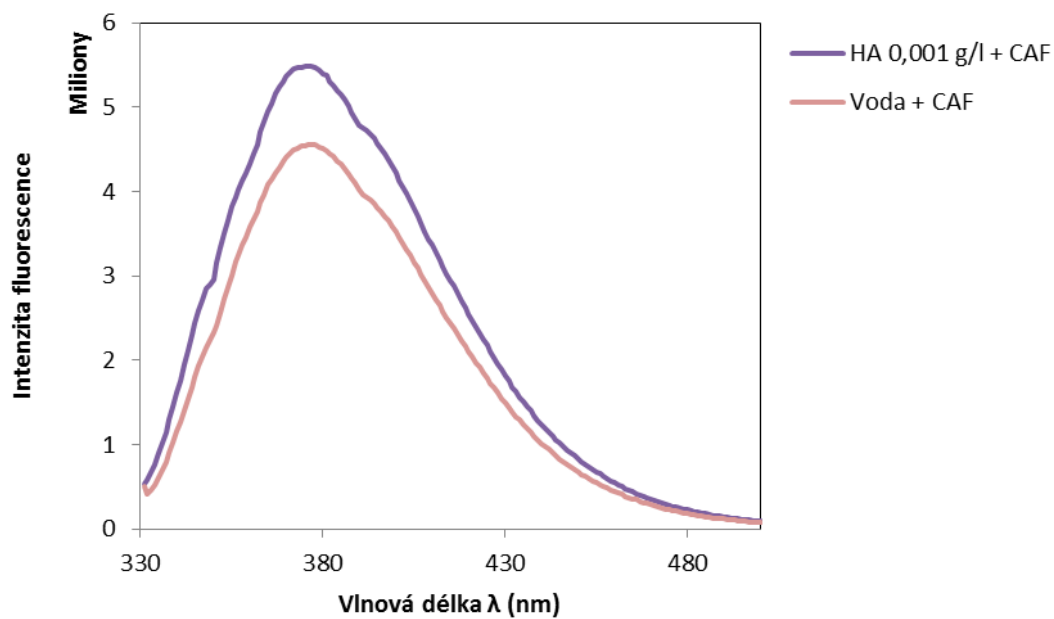
Graf 5. Emisní spektrum kofeinu-vody a kofeinu-HA o koncentraci 1 g/l



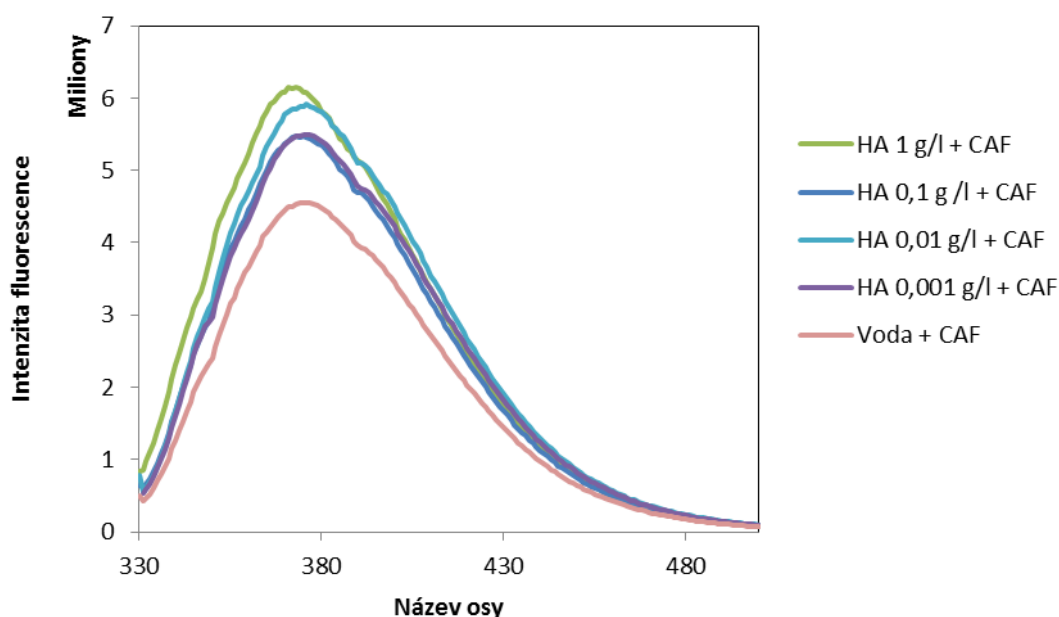
Graf 6. Emisní spektrum kofeinu-vody a kofeinu-HA o koncentraci 0,1 g/l



Graf 7. Emisní spektrum kofeinu-vody a kofeinu-HA o koncentraci 0,01 g/l



Graf 8. Emisní spektrum kofeinu-vody a kofeinu-HA o koncentraci 0,001 g/l



Graf 9. Emisní spektrum kofeinu-vody a kofeinu-HA o všech koncentracích

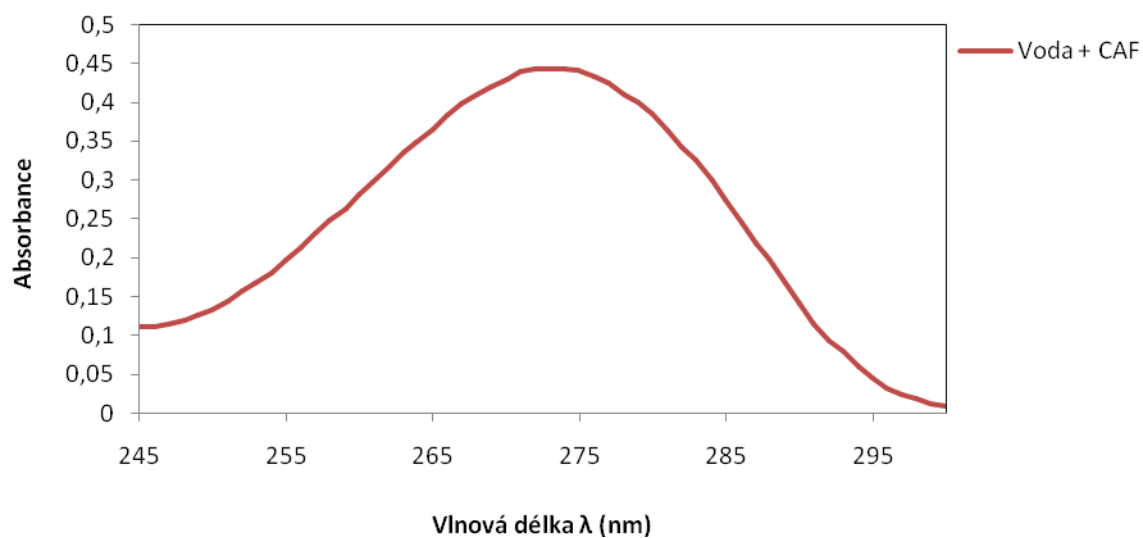
9.3 Měření absorpčních spekter kofeinu a HA v různě kyselém pH

Výše popsaným postupem bylo měřeno absorpční spektrum kofeinu v roztocích o různých koncentracích HA (1 g/l, 0,1 g/l, 0,01 g/l, 0,001 g/l), při různém pH (pH = 1; pH = 1,7; pH = 2,3; pH = 3,2) po odstředění.

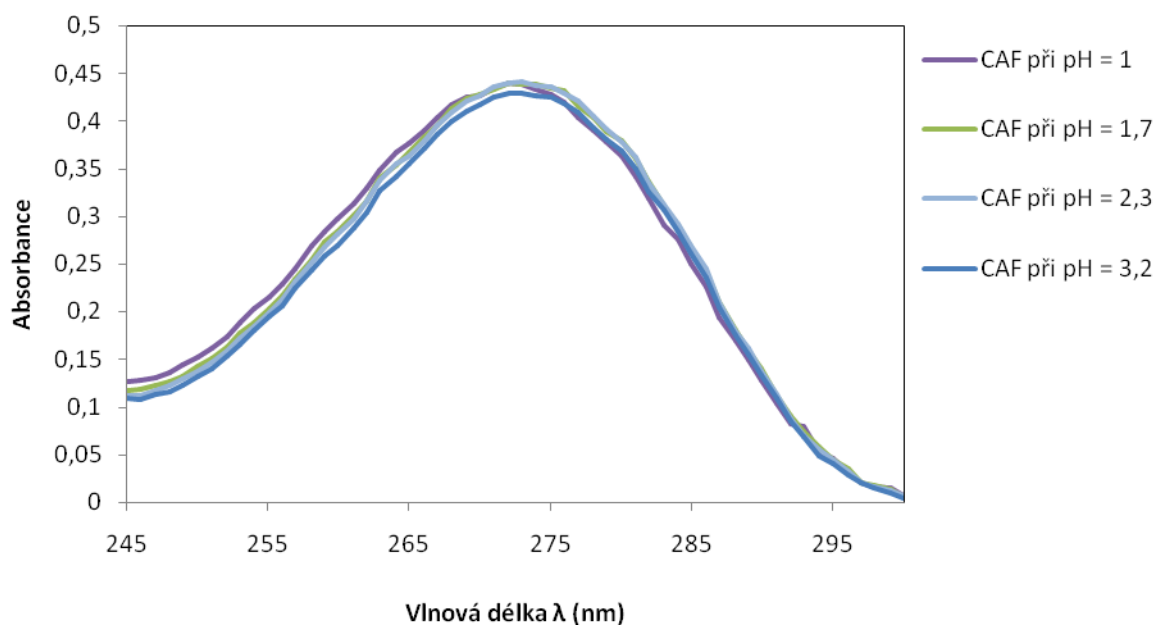
V prvním měření bylo zjišťováno, s jakou koncentrací kofeinu lze měřit. Koncentrace byla snížena o dva řády z $3,09 \cdot 10^{-3}$ mol/l na $3,09 \cdot 10^{-5}$ mol/l a byla to maximální možná koncentrace kofeinu v tomto měření. Pomocí stanovených molárních extinkčních koeficientů byly vypočítány koncentrace kofeinu, které jsou uvedeny v **Tab. 4**. Z této tabulky a z grafů vyplývá, že kofein s kyselinou hyaluronovou neinteraguje, protože koncentrace i λ_{\max} kofeinu zůstaly téměř stejné.

Tab. 3. První měření kofeinu při konstantní koncentraci ve vodě a v různých pH

	λ_{\max} (nm)	Absorbance	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	c_{CAF} (mol/l)
Voda	272	4,44E-01	1,44E+04	3,09E-05
CAF při pH = 1	272	4,40E-01	1,42E+04	3,09E-05
CAF při pH = 1,7	272	4,41E-01	1,43E+04	3,09E-05
CAF při pH = 2,3	273	4,41E-01	1,43E+04	3,09E-05
CAF při pH = 3,2	273	4,30E-01	1,39E+04	3,09E-05



Graf 10. Absorpční spektrum kofeinu ve vodě

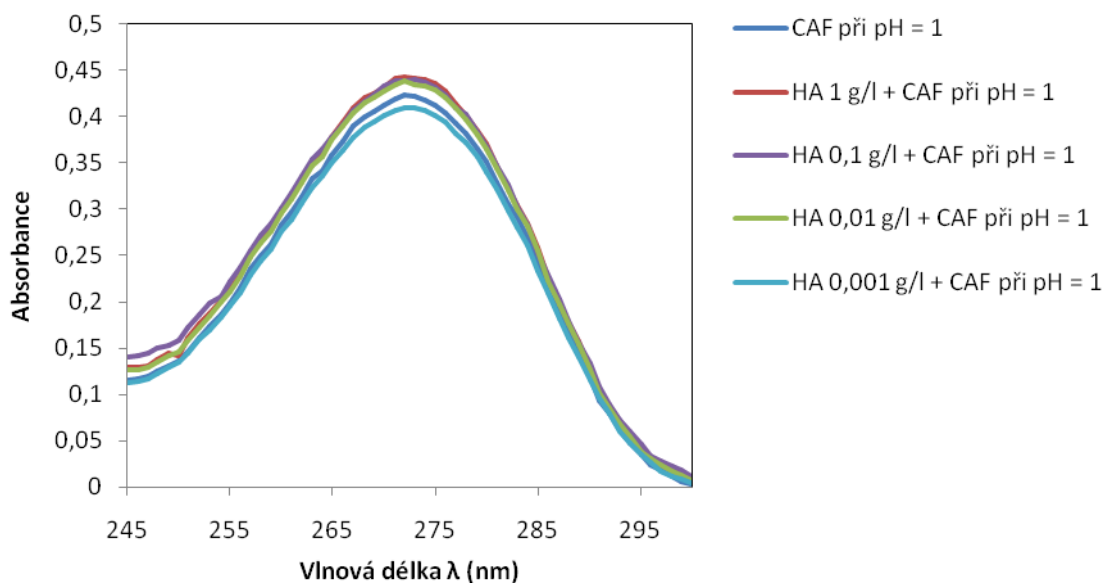


Graf 11. Absorpční spektrum kofeinu při různých pH

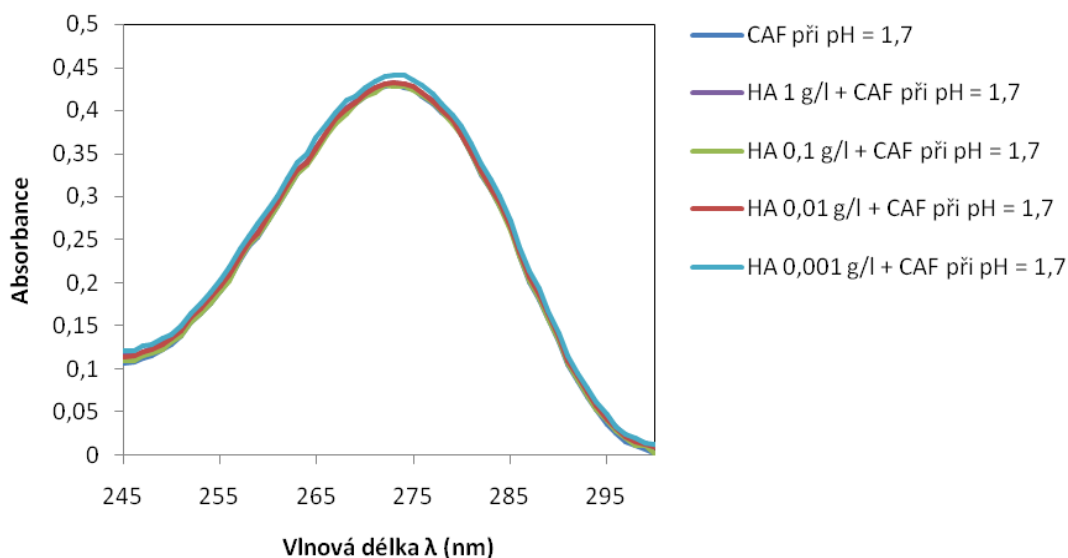
Tab. 4. Koncentrace a λ_{\max} kofeinu po odstředění různé koncentrace HA při různém pH

	c_K (mol/l) při pH = 1 - 3,2	c_K (mol/l) při pH = 1	c_K (mol/l) při pH = 1,7	c_K (mol/l) při pH = 2,3	c_K (mol/l) při pH = 3,2
HA 1 g/l + CAF	3,08E-05	3,03E-05	3,06E-05	3,11E-05	3,13E-05
HA 0,1 g/l + CAF	3,16E-05	3,16E-05	3,13E-05	3,15E-05	3,19E-05
HA 0,01 g/l + CAF	3,08E-05	3,00E-05	3,09E-05	3,11E-05	3,15E-05
HA 0,001 g/l + CAF	3,08E-05	2,99E-05	3,12E-05	3,08E-05	3,18E-05
	λ_{\max} (nm) při pH = 1 - 3,2	λ_{\max} (nm) při pH = 1	λ_{\max} (nm) při pH = 1,7	λ_{\max} (nm) při pH = 2,3	λ_{\max} (nm) při pH = 3,2
HA 1 g/l + CAF	273 ± 2	272 ± 2	272 ± 2	273 ± 2	273 ± 2
HA 0,1 g/l + CAF	273 ± 2	272 ± 2	272 ± 2	272 ± 2	274 ± 2
HA 0,01 g/l + CAF	273 ± 2	273 ± 2	272 ± 2	273 ± 2	273 ± 2
HA 0,001 g/l + CAF	273 ± 2	272 ± 2	273 ± 2	272 ± 2	273 ± 2

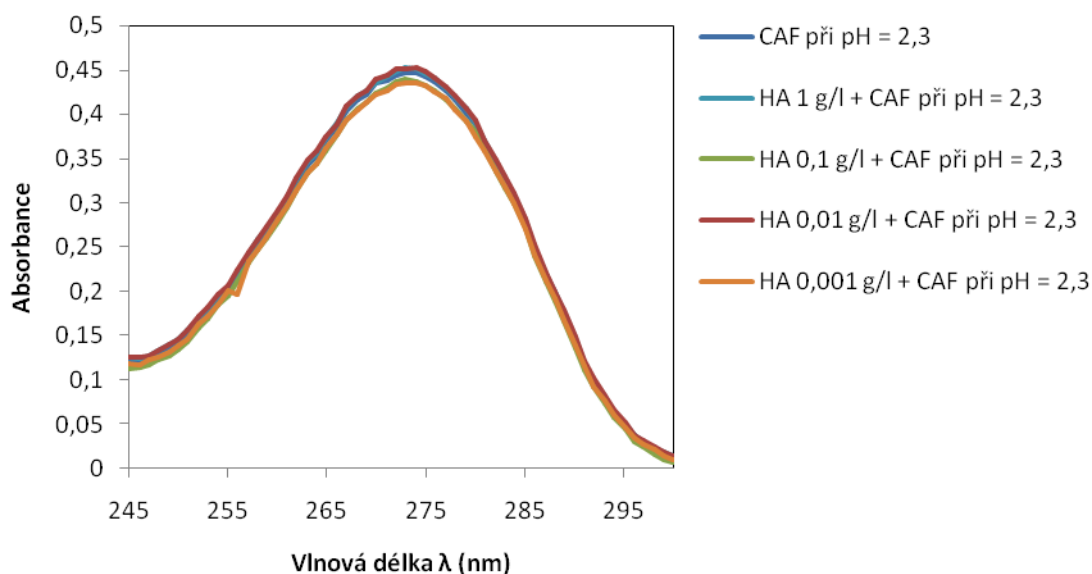
Z Tab. 4. a Grafů 12-19. je patrné, že koncentrace kofeinu a λ_{\max} se nemění a nedochází k žádnému posunu absorpčních maxim kofeinu a tedy k žádné interakci mezi kofeinem a kyselinou hyaluronovou. Dále lze porovnat spektra kofeinu dle pH či koncentrace HA.



Graf 12. Absorpční spektra kofeinu při pH = 1 po odstředění HA

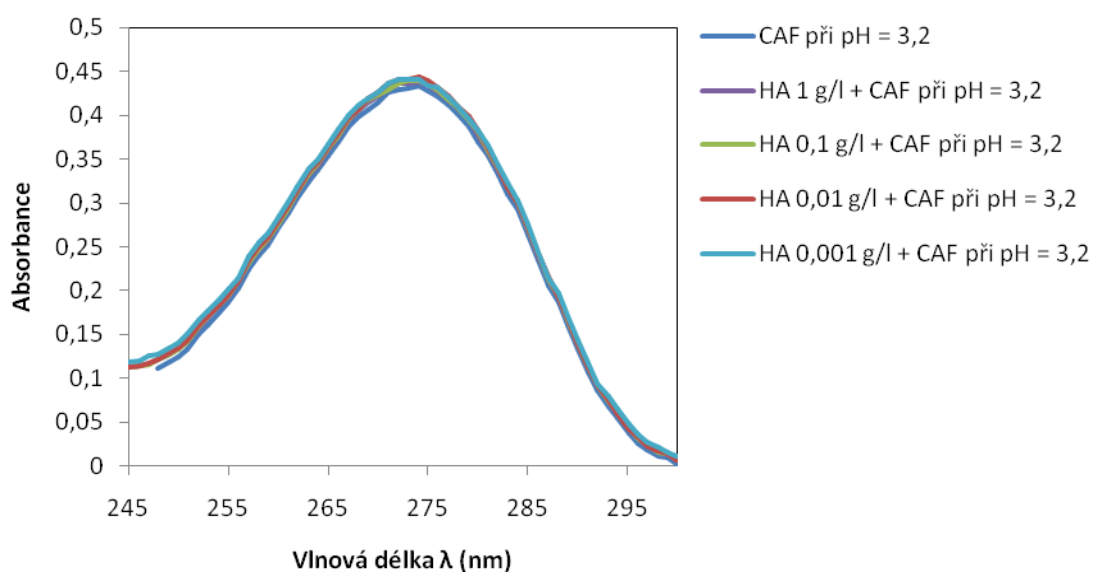


Graf 13. Absorpční spektra kofeinu při pH = 1,7 po odstředění HA

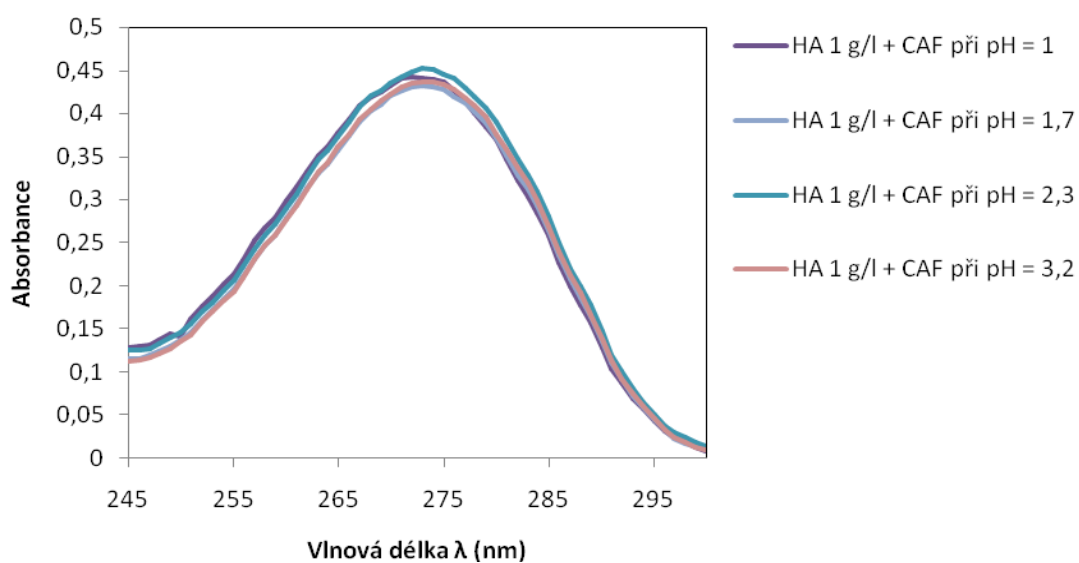


Graf 14. Absorpční spektra kofeinu při pH = 2,3 po odstředění HA

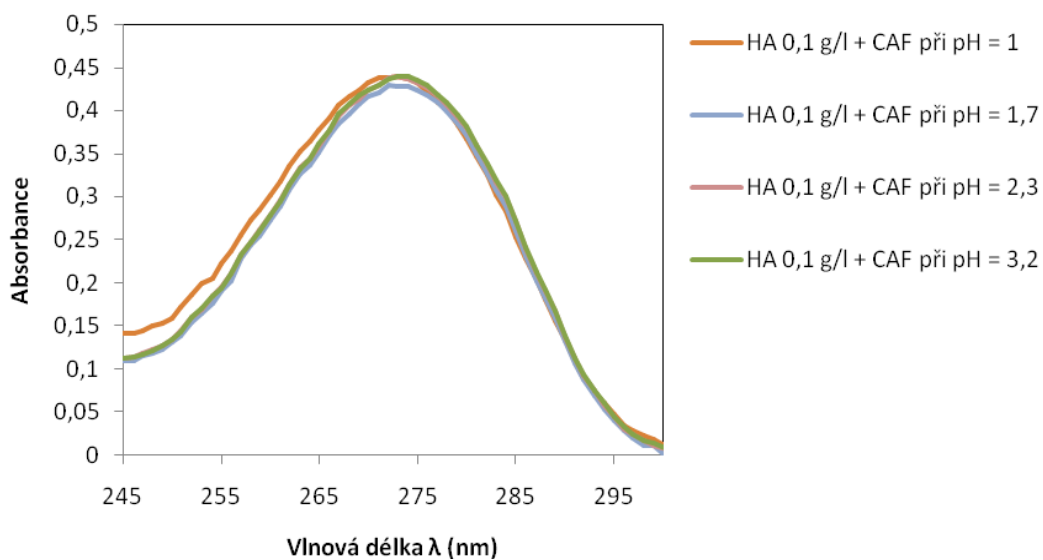
Z Grafu 12-15. lze porovnat absorpční spektra roztoků kyseliny hyaluronové o různém pH s absorpčním spektrem vodného roztoku kofeinu při příslušném pH.



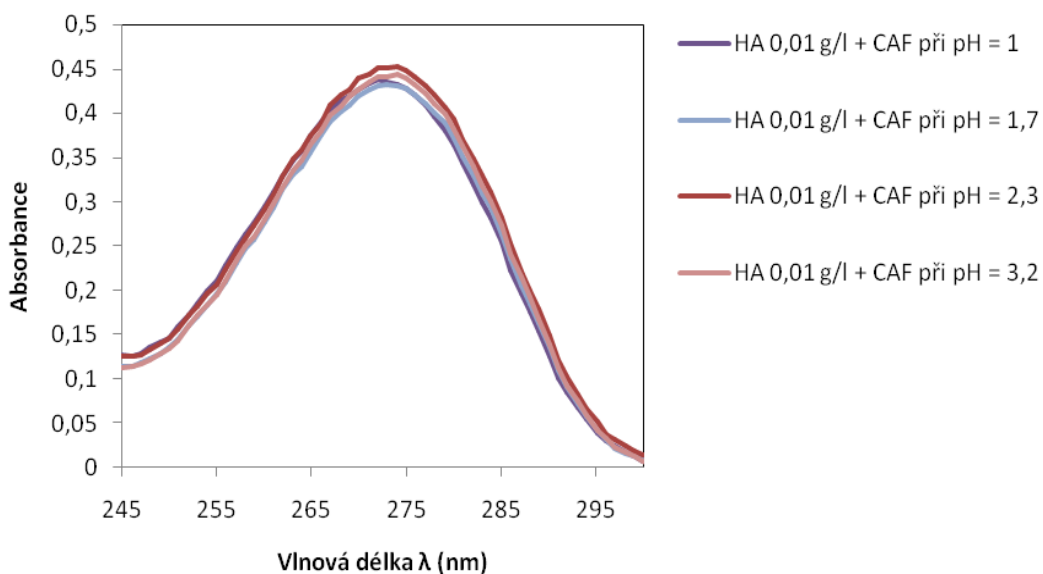
Graf 15. Absorpční spektra kofeinu při pH = 3,2 po odstředění HA



Graf 16. Absorpční spektra kofeinu při koncentraci 1 g/l HA v různých pH po odstředění

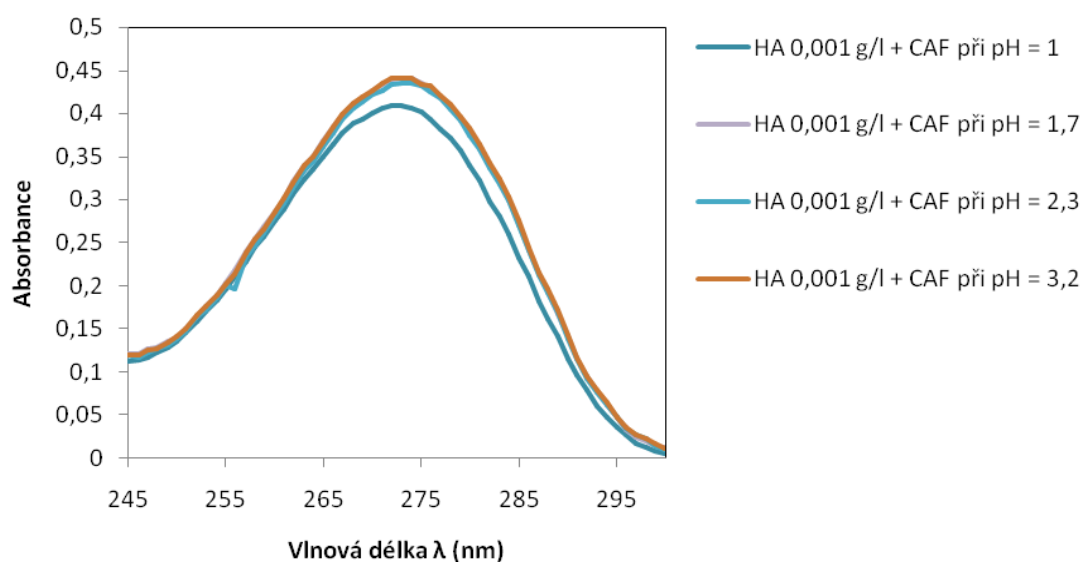


Graf 17. Absorpční spektra kofeinu při koncentraci 0,1 g/l HA v různých pH po odstředění



Graf 18. Absorpční spektra kofeinu při koncentraci 0,01 g/l HA v různých pH po odstředění

Z **Grafu 16-19**. lze porovnat absorpční spektra roztoků kyseliny hyaluronové o různém pH s absorpčním spektrem vodného roztoku kofeinu při příslušném pH.

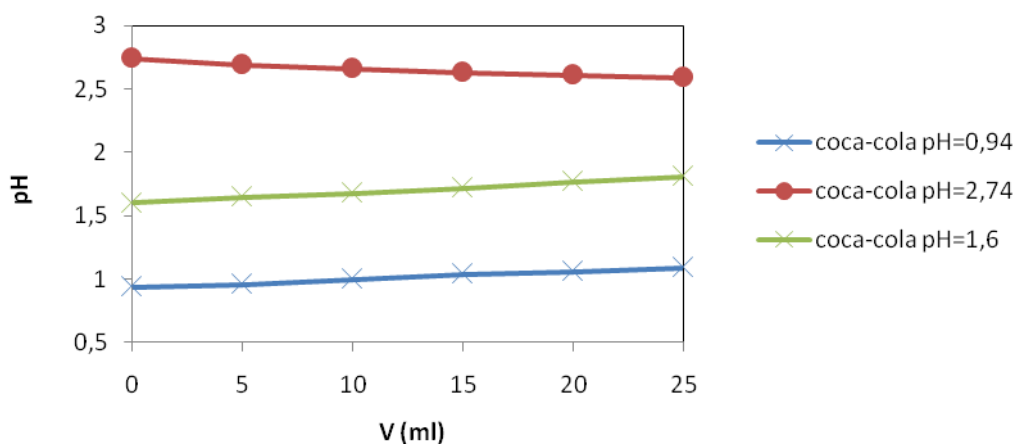


Graf 19. Absorpční spektra kofeinu při koncentraci 0,001 g/l HA v různých pH po odstředění

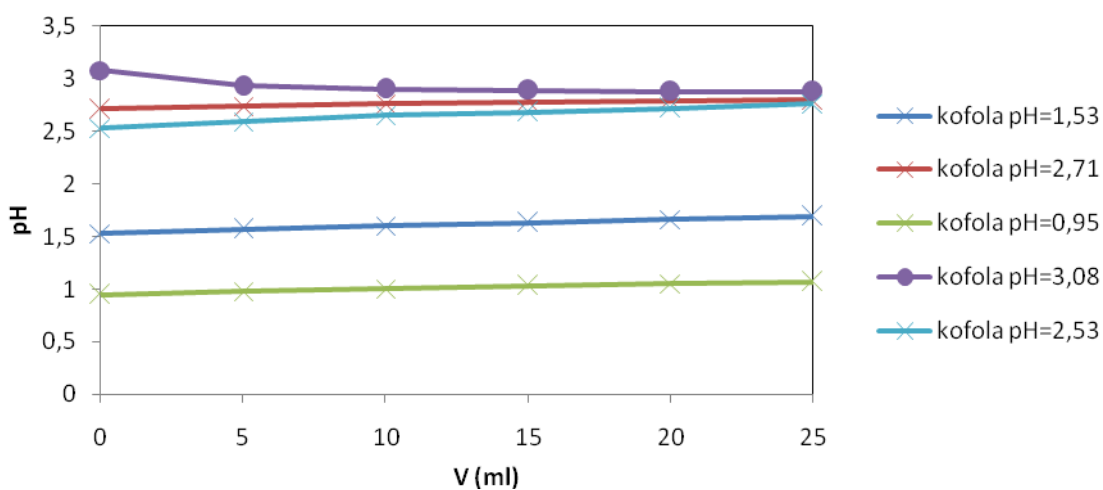
9.4 Stanovení pH v modelových žaludečních šťávách

Výše popsaným postupem bylo měřeno pH roztoku při přidávání Coca-Coly a Kofoly s různým počátečním pH.

Z **Grafu 20 a 21**. lze porovnat patrný nárůst pH při přidávání Kofoly či Coca-Coly do roztoku o nižším pH. Naopak při přidávání Kofoly či Coca-Coly do roztoku o vyšším pH byl pozorován jen nepatrný pokles pH, z toho vyplývá, že v žaludku pitím Coca-Coly nebo Kofoly se pH téměř nemění, ať už je žaludek prázdný nebo plný.



Graf 20. Závislost pH na přidávaném objemu Coca-Coly do roztoku o různém počátečním pH

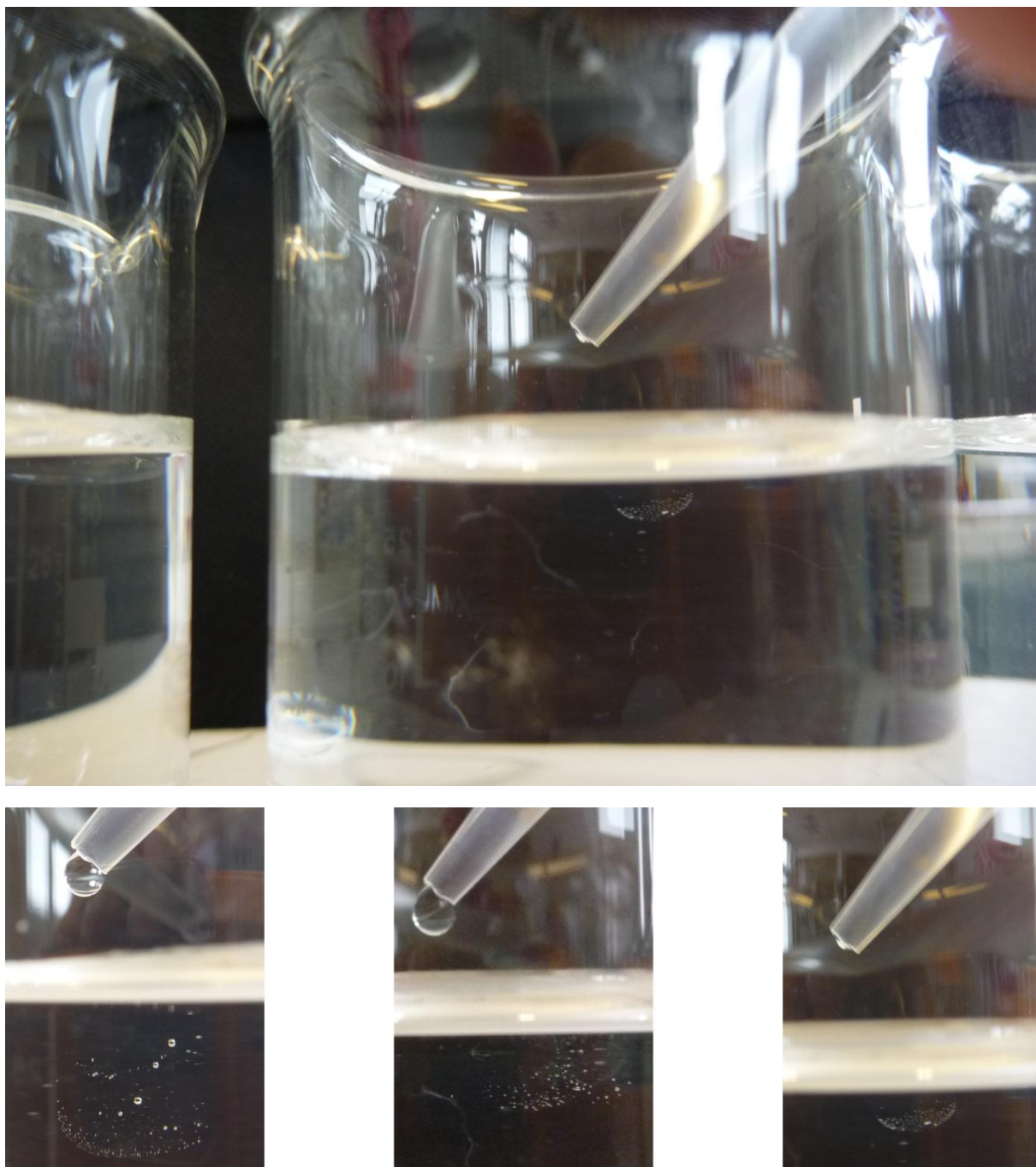


Graf 21. Závislost pH na přidávaném objemu Kofoly do roztoku o různém počátečním pH

9.5 Vizuální pozorování chování kyseliny hyaluronové v kyselém pH

Výše popsaným postupem bylo stanoveno pH Coca-Coly na 2,45 a Kofoly na 2,95. Obě pH jsou velmi nízké.

Dále při přikapávání kyseliny hyaluronové do kyselých roztoků nebo do Coca-Coly či Kofoly, které mají nízké pH, bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová vytváří průhledné částice nepravidelných tvarů, které by do sebe mohly uzavřít kofein, jak je tomu vidět na obrázcích díky bublinám vzduchu.



Obr. 6. Různé tvary HA v kyselém prostředí s bublinkami vzduchu

10 ZÁVĚR

Teoretická část byla zaměřena především na obecné seznámení s kofeinem, jeho vstřebáváním, cestami v těle, čaj a kávu, a s hyaluronanem a fluorescenční spektroskopii. Rešeršní část byla zaměřena na poznatky o vstřebávání kofeinu, žádoucích a nežádoucích účincích a fotofyzikálních vlastnostech kofeinu.

Cílem práce bylo získat základní informace o interakci mezi zvoleným polysacharidem hyaluronanem (HA) a alkaloidem kofeinem (CAF). Stanovit fotofyzikální vlastnosti kofeinu. Zjistit, jak se chová hyaluronan v silně kyselém prostředí. Stanovit pH v modelových žaludečních šťávách po příjmu Coca-Coly a Kofoly.

Kofein reaguje na polaritu různých rozpouštědel, ale při měření emisních spekter roztoků kofeinu spolu s hyaluronanem nebyl zjištěn žádný posun emisních maxim, z toho vyplývá, že nedošlo k interakci mezi kofeinem a kyselinou hyaluronovou. Potvrzuje to i měření absorpčních spekter po odstředění, protože koncentrace kofeinu a λ_{\max} zůstaly téměř stejné.

Dále byl zjištěn patrný nárůst pH při přidávání Kofoly či Coca-Coly do roztoku o nižším pH. Naopak při přidávání Kofoly či Coca-Coly do roztoku o vyšším pH byl pozorován jen nepatrný pokles pH, z toho vyplývá, že v žaludku pitím Coca-Coly nebo Kofoly se pH téměř nemění, ať už je žaludek prázdný nebo plný. Bylo také stanoveno pH Coca-Coly na 2,45 a Kofoly na 2,95. Obě pH jsou velmi nízká. Při přikapávání kyseliny hyaluronové do kyselých roztoků, jako je tomu v žaludku v našem těle, nebo do Coca-Coly či Kofoly, které mají nízké pH, bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová vytváří průhledné částice nepravidelných tvarů, které by do sebe mohly uzavřít kofein.

11 LITERATURA

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie III: Od objevu genu ke genovému inženýrství. Rostliny - důležitý zdroj přírodních látek. Mikroorganismy - producenti důležitých látek. Biochemie cizorodých látek. Aplikov. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 191 s. ISBN 80-200-0471-8.
- [2] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin 3. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [3] Alkaloids isolated from south african menispermaceae. Chapter 5. [cit. 28. 4. 2012]. Dostupné z: <https://ujdigispace.uj.ac.za/bitstream/handle/10210/233/Chapter5.pdf>
- [4] Vlas, T.: Alkaloidy. [cit. 25. 4. 2012]. Dostupné z: <http://projektalfa.ic.cz/alkaloidy.htm>
- [5] KREJČÍ, Ivan. O kávě a čaji, aneb, Víme proč je pijeme?. Vyd. 1. Praha: Grada, 2000, 100 s. Zdraví, sv. 15. ISBN 80-716-9535-1.
- [6] PROCHÁZKA, Vladimír. Příruční slovník naučný II. (G-L). 1. vyd. Praha: NČAV, 1963, 919 s.
- [7] Bezpečnostní list pro kofein. Ing. Petr Švec – PENTA, 1.2.2012. [cit. 4. 4. 2012]. Dostupné z: http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/c/bezplist_662.pdf
- [8] UCUN, Fatih, Adnan SAĞLAM a Vesile GÜÇLÜ. Molecular structures and vibrational frequencies of xanthine and its methyl derivatives (caffeine and theobromine) by ab initio Hartree-Fock and density functional theory calculations. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2007, roč. 67, č. 2, s. 342-349. ISSN 13861425. DOI: 10.1016/j.saa.2006.07.029. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142506004203>
- [9] EMEL'YANENKO, Vladimir N. a Sergey P. VEREVKIN. Thermodynamic properties of caffeine: Reconciliation of available experimental data. The Journal of Chemical Thermodynamics. 2008, roč. 40, č. 12, s. 1661-1665. ISSN 00219614. DOI: 10.1016/j.jct.2008.07.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021961408001493>
- [10] FISONE, G., A. BORGKVIST a A. USIELLO. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS). 2004-4-1, roč. 61, č. 7-8, s. 857-872. ISSN 1420-682x. DOI: 10.1007/s00018-003-3269-3. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article>
- [11] LIGUORI, A., HUGHES, R. J., GRASS, A. J. Absorption and Subjective Effects of Caffeine from Coffee, Cola and Capsules. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 1997-1-27, roč. 58, s. 721-726. ISSN 0091-3057. DOI: 10.1016/S0091-3057(97)00003-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305797000038>
- [12] MICHAEL ZIMMERMAN, P, J PULLIAM, J SCHWENGELS a S MACDONALD. Caffeine intoxication: A near fatality. Annals of Emergency Medicine. 1985, roč. 14, č. 12, s. 1227-1229. ISSN 01960644. DOI: 10.1016/S0196-0644(85)81035-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196064485810350>
- [13] KERRIGAN, Sarah a Tania LINDSEY. Fatal caffeine overdose: Two case reports. Forensic Science International. 2005-5-4, roč. 153, č. 1, s. 67-69. ISSN 0379-0738. DOI: 10.1016/j.forsciint.2005.04.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073805002057>
- [14] KUCZKOWSKI, K.M. Caffeine in pregnancy: A cause for concern?. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation. 2009, roč. 28, č. 6, s. 605-607. DOI:

- 10.1016/j.annfar.2009.04.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0750765809002196>
- [15] Best, B.: Is Caffeine a Health Hazard? [cit. 25. 4. 2012]. Dostupné z: <http://www.benbest.com/health/caffeine.html>
- [16] Sun Ha Jee; Jiang He; Paul K. Whelton; IlSuh; Michael J. Klag. TheEffect of ChronicCoffeeDrinking on BloodPressure A Meta-Analysis of ControlledClinicalTrials. Hypertension. 1999, roč. 33, s. 647-652. ISSN 0194-911X. DOI: 10.1161/01.HYP.33.2.647. Dostupné z: <http://hyper.ahajournals.org/content/33/2/647.short>
- [17] EVANS, Suzette M. a Roland R. GRIFFITHS. Caffeine tolerance and choice in humans. Psychopharmacology. 1992, roč. 108, č. 1-2, s. 51-59. DOI: 10.1007/BF02245285. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02245285>
- [18] MICHAEL F. LEITZMANN, WALTER C. WILLETT, ERIC B. RIMM, MEIR J. STAMPFE, DONNA SPIEGELMAN, GRAHAM A. COLDITZ, EDWARD GIOVANNUCCI. A Prospective Study of CoffeeConsumption and the Risk of SymptomaticGallstoneDisease in Men. Journal of theamericanmedicalassociation. 1999, č. 22, s. 2106-2112. ISSN 0002-9262. DOI: 10.1001/jama.281.22.2106. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=4&SID=N1Fc7E73IlAk8njBJhC&page=1&doc=1
- [19] EHRLICH, A., S., LUCKER, P., W., SCHAEFER, A. Effect of processed and non-processedcoffeesamples on gastricpotentialdifference - Study withhealthy male helicobacterpylori-positive and helicobacterpylori-negative volunteers. Arzneimittel-forschung-drugresearch. 1999, roč. 49, č. 7, s. 626-630. ISSN 0004-4172. DOI: 10.1055/s-0031-1300473. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=21&SID=N1Fc7E73IlAk8njBJhC&page=1&doc=1
- [20] CHOU, Tony M. a Neal L. BENOWITZ. Caffeine and coffee: effects on health and cardiovascularisease. ComparativeBiochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 2003, roč. 109, s. 173–189. DOI: 10.1016/0742-8413(94)00048-F. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/074284139400048F>
- [21] SMITH, Barry D., David CRANFORD a Lee GREEN. Hostility and caffeine: cardiovasculareffectsduring stress and recovery. Personality and IndividualDifferences. 2001, roč. 30, č. 7, s. 1125–1137. ISSN 0191-8869. DOI: 10.1016/S0191-8869(00)00097-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0191886900000970>
- [22] STRONG, F., C.Itmaybethcaffeine in Extra StrengthExcedrinthatiseffectiveformigraine. PharmPharmacol. 1997, roč. 49, s. 1260. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06082.x. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466355>
- [23] VIANNA, E.O. a R.J. MARTÍN. Bronchodilators and corticosteroids in thetreatment of asthma. Drugs of Today. 1998, roč. 34, s. 203. ISSN 1699-3993. DOI: 10.1358/dot.1998.34.3.485166. Dostupné z: http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=4
- [24] Hara Y. Influence of teacatechins on the digestive tract. Journal of cellularbiochemistry. Supplement. 1997, roč. 27, s. 52-58. ISSN 0733-1959. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(1997)27+<52::AID-JCB10>3.0.CO;2-N. Dostupné z: <http://www.mendeley.com/research/influence-tea-catechins-digestive-tract/#>

- [25] Miyagawa C, Wu C, Kennedy DO, Nakatani T, Ohtani K, Sakanaka S, Kim M, Matsui-Yuasa I. Protective effect of green tea extract and tea polyphenols against the cytotoxicity of 1,4-naphthoquinone in isolated rat hepatocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1997, roč. 61, č. 11, s. 1901-1905. ISSN 0916-8451. DOI:10.1271/bbb.61.1901. Dostupné z: http://www.journalarchive.jst.go.jp/english/jnlabstract_en.php?cdjournal=bbb1992&cdvol=61&noissue=11&startpage=1901
- [26] KARIM, Mohammad Mainul, Chi Wan JEON, Hyun Sook LEE, Seikh Mafiz ALAM, Sang Hak LEE, Jong Ha CHOI, Seung Oh JIN a Ajoy Kumar DAS. Simultaneous Determination of Acetylsalicylic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulation by First Derivative Synchronous Fluorimetric Method. *Journal of Fluorescence*. 2006-9-29, roč. 16, č. 5, s. 713-721. ISSN 1053-0509. DOI: 10.1007/s10895-006-0115-7. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10895-006-0115-7>
- [27] FRANKS, H. M., H. HAGEDORN, V. R. HENSLEY, W. J. HENSLEY a G. A. STARMER. The effect of caffeine on human performance, alone and in combination with ethanol. *Psychopharmacology*. 1975, roč. 45, č. 2, s. 177-181. DOI: 10.1007/BF00429058. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00429058>
- [28] HASENFRATZ, M., A. BUNGE, G. DAL PRÁ a K. BÄTTIG. Antagonistic effects of caffeine and alcohol on mental performance parameters. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1993, roč. 46, č. 2, s. 463-465. ISSN 0091-3057. DOI: 10.1016/0091-3057(93)90380-C. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009130579390380C>
- [29] ARTS, Ilja CW, Peter CH HOLLMAN a Daan KROMHOUT. Chocolate as a source of tea flavonoids. *The Lancet*. 1999, roč. 354, č. 9177, s. 488. ISSN 0140-6736. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)02267-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673699022679>
- [30] HERTOGE, M.G.L, E.J.M FESKENS, D KROMHOUT, M.G.L HERTOGE, P.C.H HOLLMAN, M.G.L HERTOGE a M.B KATAN. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*. 1993-10-23, roč. 342, č. 8878, s. 1007-1011. ISSN 0140-6736. DOI: 10.1016/0140-6736(93)92876-U. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014067369392876U>
- [31] QUINLAN, P., Joan LANE a Laurence ASPINALL. Effects of hot tea, coffee and watering ingestion on physiological responses and mood: the role of caffeine, water and beverage type. *Psychopharmacology*. 1997-5-23, roč. 134, č. 2, s. 164-173. ISSN 0033-3158. DOI: 10.1007/s002130050438. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article>
- [32] KATAN Martijn B ; SCHOUTEN Evert. Caffeine and arrhythmia. *The American journal of clinical nutrition*. 2005, roč. 81, č. 3, s. 539-540. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <http://www.ajcn.org/content/81/3/539.full#FN2>
- [33] Caffeine Content of Drinks. [cit. 25. 4. 2012]. Dostupné z: <http://www.energyfiend.com/the-caffeine-database>
- [34] Klementová, Š. Molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti. 2005, poslední revize 1.8.2005 [cit. 25. 4. 2012]. Dostupné z: http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab.htm

- [35] Základy analytické chemie II. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [36] Fluorescence. [cit. 24. 4. 2012]. Dostupné z: <<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence>>.
- [37] MEYER, K., PALMER, J. The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of biological chemistry*, 1934, roč. 107, s. 629-634. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/107/3/629.full.pdf>
- [38] PRICE, R. D., BERRY, M. G., NAVSARIA, H. A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2007, roč. 60, č. 10 s. 1110-1119. ISSN 1748-6815. DOI: 10.1016/j.bjps.2007.03.005. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748681507001805>
- [39] VOET, Donald. Biochemie. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.
- [40] COWMAN, K. M., MATSUOKA, S.: Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate research*, 2005, roč. 340, č. 5, s. 791-809. ISSN 0008-6215. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621505000534>
- [41] KOGAN, G., ŠOLTÉS, S., STERN, R., GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, roč. 29, č. 1, s. 17-25. ISSN 0141-5492. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/content/wr1138754j2665u1/>
- [42] DAY, A. J., SHEENAN, J. K. Hyaluronan: Polysaccharide chaos to protein organisation. *Current opinion in structural biology*. 2001, roč. 11, č. 5, s. 617-622. DOI: 10.1016/S0959-440X(00)00256-6. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X00002566>
- [43] LAURENT, T. C., FRASER, J. R. E. Hyaluronan. *The FASEB Journal*, 1992, roč. 6, s. 2397-2404. ISSN 0892-6638. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/content/6/7/2397.short>
- [44] SLEVIN, M., et al.: Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol*, 2007, roč. 26, č. 1, s. 58-68. ISSN 0945-053X. DOI: 10.1016/j.matbio.2006.08.261. Dostupné z: <http://e-space.mmu.ac.uk/e-space/handle/2173/13181>
- [45] Chemistry and biology of hyaluronan [online]. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, 605 s. [cit. 2012-04-27]. ISBN 00-804-4382-6. Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=WCjv3-q2ggC&oi=fnd&pg=PA71&dq=related:vdtDAMpE6eAJ:scholar.google.com/&ots=FQo2W8HHuv&sig=7ebHVbQl3Lx4QLLc_nDuEH1lcGk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [46] LAPČÍK, L., et al. Hyaluronan: Structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, 1998, roč. 98, č. 8, s. 2663-2684. ISSN 1520-6890. DOI: 10.1021/cr941199z. Dostupné z: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/11848975>
- [47] WEIGEL P. H., HASCALL V. C., TAMMI M. Hyaluronan synthases. *The Journal of biological chemistry*. 1997, roč. 272, č. 22, s. 13997-14000. ISSN 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.272.22.13997. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/272/22/13997.short>

- [48] HERSLÖV, K., SUNDELÖF, L., EDSMAN, K. Interaction between Polyelectrolyte and Surfactant of Opposite Charge. Hydrodynamic Effects in the Sodium Hyaluronate/Tetradecyltrimethylammonium Bromide/Sodium Chloride/Water System. *J. Phys. Chem.*, 1992, roč. 96, č. 5, s. 2345-2348. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100184a061. Dostupné z: <http://3249238492kljf-pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100184a061>
- [49] BALAZS, E. A.: Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof. *US-Patent*, 1979, 4, 141, 193. [cit. 2012-04-27]. Dostupné z: <http://www.google.cz/patents?hl=cs&lr=&vid=USPAT4141973&id=4cwxAAAAEBAJ&oi=fnd&printsec=abstract#v=onepage&q&f=false>